

**Die sauerstoffabhängige  
Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) aus  
*Escherichia coli***

**Rekombinante Herstellung, biochemische und  
biophysikalische Charakterisierung**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

**Dissertation**

von Diplom-Chemikerin  
**Esther Mahlitz**  
aus Berlin

**1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn**

**2. Referent: Priv.-Doz. Dr. Dirk Heinz**

**eingereicht am: 03.01.2002**

**mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.03.2002**

**gedruckt 2002**

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. Dieter Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Tagungsbeiträge

Mahlitz, E. & Jahn, D.: Structural and functional characterization of recombinant oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) of *Escherichia coli*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Göttingen (1999).

Mahlitz, E. & Jahn, D.: Structural and functional characterization of *Escherichia coli* oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF). (Poster) 27. Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Verbindung mit dem 37th IUPAC Congress "Frontiers in Chemistry: Molecular Basis of the Life Sciences", Berlin (1999).

Mahlitz, E., Sauerwald, A. & Jahn, D.: Structure and function of *Escherichia coli* oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF). (Poster) Gordon Research Conference on the Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, Newport, Rhode Island, USA (2000).

### Vorträge

Mahlitz, E.: The *Escherichia coli* oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF). Einladung von Prof. Dr. J. C. Lagarias und Dr. N. Frankenberg, Section of Molecular & Cellular Biology, University of California at Davis, USA (2000).

Diese Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie, Fakultät für Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und am Institut für Mikrobiologie, Fakultät für Biowissenschaften und Psychologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. Dieter Jahn angefertigt.

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden.

*Ich weiß nicht, wie die Welt mich sieht; aber mir selbst komme ich nur wie ein Junge vor, der zum Zeitvertreib am Strande spielt, dabei einen besonders glatten Kiesel oder eine außergewöhnlich schöne Muschelschale findet, während der große Ozean der Wahrheit völlig unentdeckt vor mir liegt.*

Sir Isaac Newton

*Erfahrung nennt man die Summe aller unserer Irrtümer.*

Thomas Alva Edison

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Tetrapyrrole.....	1
1.2	Die Enzyme der Häm-Biosynthese .....	1
1.3	Coproporphyrinogen III Oxidasen .....	6
1.3.1	Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase HemN .....	6
1.3.2	Die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase HemF .....	7
1.3.3	Postulierte Mechanismen für die katalysierte Reaktion der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) .....	8
1.4	Die Bindung von Sauerstoff in Mangan-haltigen Enzymen .....	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1	Abkürzungen .....	15
2.2	Geräte und Chemikalien.....	15
2.2.1	Chemikalien und Kits .....	16
2.3	Bakterienstämme und Plasmide .....	17
2.4	Puffer und Lösungen .....	19
2.4.1	Agarose Gelelektrophorese .....	19
2.4.2	DNA-Präparation .....	19
2.4.3	Protein-Präparation .....	19
2.4.4	Enzymtest.....	20
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	20
2.4.6	Western Blotting .....	21
2.5	Kulturmedien und Medienzusätze .....	22
2.5.1	Medien .....	22
2.5.2	Zusätze .....	22
2.6	Mikrobiologische Techniken .....	23
2.6.1	Sterilisation .....	23
2.6.2	Wachstumsbedingungen .....	23
2.6.3	Bestimmung von Zelldichten .....	23
2.7	Molekularbiologische Techniken.....	23
2.7.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR-Technik .....	23
2.7.2	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	25
2.7.3	Transformation von Bakterien .....	25

2.7.4	Plasmidpräparation .....	25
2.7.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	26
2.7.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.7.7	DNA-Primer für die Mutagenese.....	26
2.7.8	Einführung einer Punktmutation in ein Gen .....	28
2.7.9	DNA-Sequenzierung.....	29
2.8	Proteinchemische Methoden .....	29
2.8.1	Rekombinante Darstellung von <i>E. coli</i> HemF .....	29
2.8.2	Chromatographische Reinigung und Analyse von rekombinantem HemF .....	31
2.8.3	Anaerobe Darstellung von rekombinantem HemF .....	32
2.8.4	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.8.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.8.6	Elektrotransfer und N-terminale Proteinsequenzierung des HemF-Spaltproduktes .....	34
2.8.7	Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS) .....	35
2.8.8	Glycerindichtegradientenzentrifugation .....	35
2.8.9	Bestimmung der Aktivität von HemF .....	35
2.8.10	Untersuchung der Coproporphyrinogen III-Oxidase-Aktivität mittels HPLC .....	37
2.8.11	Addition von Chelatisierungsreagenzien und Metallen.....	38
2.8.12	Addition von Radikalfängern zum anaeroben Aktivitätstest .....	38
2.8.13	Entfaltung von HemF mittels Harnstoff und Rückfaltung in An- und Abwesenheit von Metallionen .....	39
2.8.14	Spektroskopischer Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der von HemF katalysierten Reaktion.....	39
2.8.15	Proteinmodifikationen.....	40
2.8.16	Kristallisation von HemF .....	41
2.9	Biophysikalische Methoden .....	42
2.9.1	Metallbestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie.....	42
2.9.2	Zirkularer Dichroismus und magnetischer zirkularer Dichroismus.....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
3.1	Etablierung eines <i>Escherichia coli</i> hemF-Expressionssystems .....	52
3.2	Produktion und Reinigung des rekombinanten HemF aus <i>Escherichia coli</i> ..	53
3.2.1	Affinitätschromatographische Reinigung unter Verwendung von Calcium- ionen und EGTA .....	53
3.2.2	Affinitätschromatographische Reinigung unter Verwendung Manganionen und dem Calmodulin-Inhibitor W7 .....	55
3.2.3	Zellzucht im großtechnischen Maßstab .....	55
3.3	Charakterisierung des gereinigten rekombinanten HemF aus <i>Escherichia coli</i> .....	56
3.3.1	N-terminale Edman-Sequenzierung und ESI-Massenspektrometrie .....	56
3.3.2	Gelpermeationschromatographie und native molekulare Masse .....	57
3.4	Etablierung eines Aktivitätstest-Systems für <i>Escherichia coli</i> HemF .....	58
3.4.1	Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie .....	58

3.4.2	Identifizierung von Tetrapyrrolen mittels HPLC.....	59
3.4.3	Das pH-Optimum und die kinetischen Eigenschaften von HemF .....	61
3.5	Der Einfluß von Additiven auf die enzymatische Aktivität .....	62
3.5.1	<i>Escherichia coli</i> HemF ist ein Mangan-abhängiges Enzym .....	62
3.5.2	Die Nukleotid-Cofaktoren haben keinen Einfluß auf die HemF-Aktivität.....	64
3.5.3	Produkt-Inhibition der HemF-Aktivität .....	64
3.6	Identifizierung katalytisch relevanter Aminosäurereste .....	66
3.6.1	Der Einfluß von Aminosäuremodifikationsreagenzien .....	66
3.6.2	Vier Histidin- und ein Tryptophanrest sind essentiell für HemF-Aktivität .....	66
3.6.3	Untersuchung des gemeinsamen "GGGTP"-Motivs aller CPOs .....	67
3.7	Untersuchungen zum Mechanismus .....	70
3.7.1	Anaerobe Enzymaktivität von HemF.....	70
3.7.2	Der Einfluß von Radikalfängern auf die Aktivität von HemF.....	71
3.7.3	Nachweis von Peroxid als Produkt der HemF-Katalyse.....	71
3.7.4	Fragmentierung von HemF .....	72
3.8	Spektroskopische Untersuchungen .....	73
3.8.1	UV / VIS-Spektroskopie .....	73
3.8.2	Magnetischer zirkularer Dichroismus (MCD) .....	74
3.8.3	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) .....	75
3.8.4	Zirkularer Dichroismus (CD).....	76
3.9	Kristallisation von HemF .....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
6.1	Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten sauerstoffab- hängigen CoproporphyrinogenIII Oxidase (HemF) aus <i>Escherichia coli</i> .....	87
6.2	Purification and characterization of recombinant <i>Escherichia coli</i> oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) .....	88
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Tetrapyrrole

Tetrapyrrole sind ringförmige Moleküle, die als Grundbaustein einen Stickstoff enthaltenden fünfgliedrigen Heterocyclus aufweisen. Im Tetrapyrrol sind die einzelnen Pyrrole über Methinbrücken miteinander verknüpft. Die verschiedenen Tetrapyrrole unterscheiden sich in folgenden Merkmalen: Oxidationszustand des Ringsystems, Art des enthaltenden Metallions und Art der Seitenketten. Im Falle des Vitamin B<sub>12</sub> ist zusätzlich die Struktur des Ringsystems verändert. Aufgrund des Ringsystems und der koordinierten Metallionen sind Tetrapyrrole redoxaktiv. Man unterteilt Tetrapyrrole in acht verschiedene Klassen: Häme, Chlorophylle, Bakteriochlorophylle, Corrinoide, Cofaktor F<sub>430</sub>, Sirohäm, Häm *d<sub>I</sub>* und offenkettige Tetrapyrrole. Die Natur setzt Tetrapyrrole für verschiedenste Zwecke ein, so als Cofaktoren für eine große Anzahl von Enzymen, als redoxaktive Substanzen in Elektronen- und Sauerstofftransportprozessen, als Photorezeptoren in Photosystemen und als Pigmente (Jordan, 1991; Jahn *et al.*, 1996).

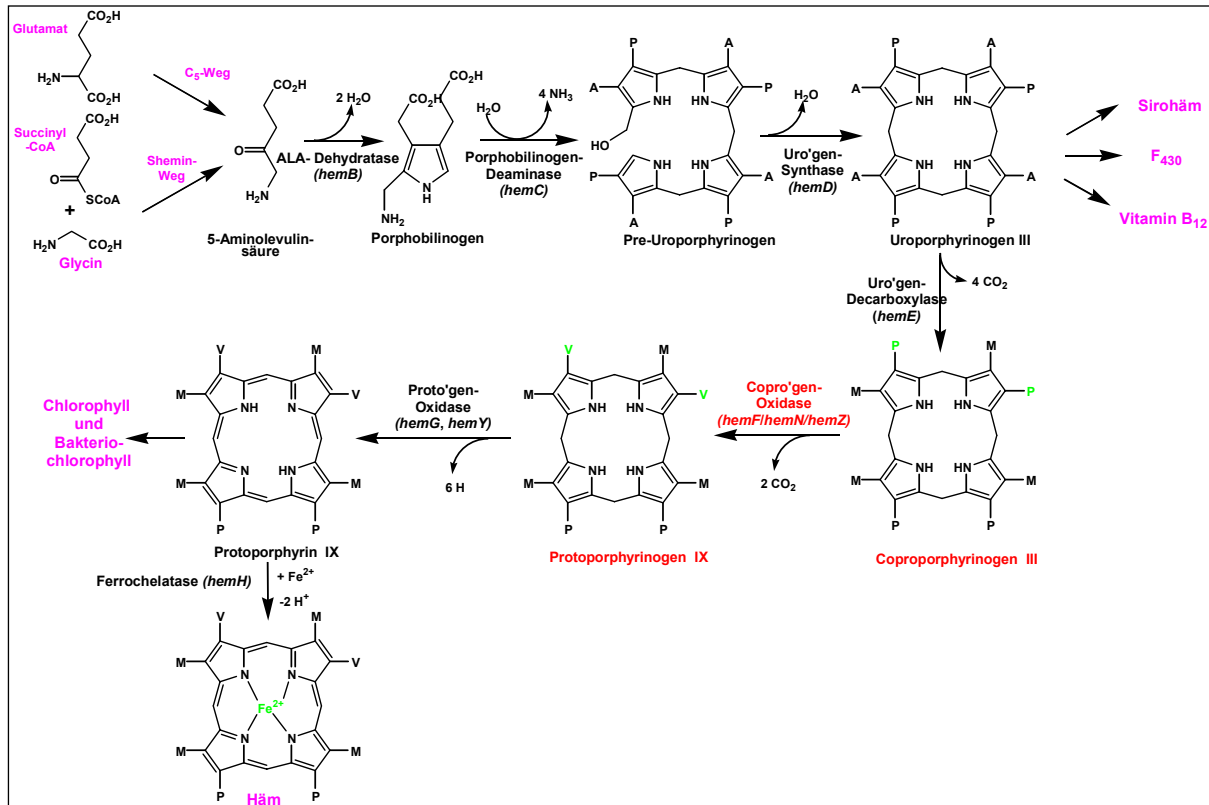
## 1.2 Die Enzyme der Häm-Biosynthese

Die Möglichkeit der Organismen dieser Erde Häm zu synthetisieren und zu nutzen stellt einen Meilenstein in der Evolution dar. Mit Hilfe von Häm als prosthetische Gruppe war eine höherwertige Energiekonservierung, ausgehend von vielfältigen Substraten über eine Kaskade von Elektronentransportketten, möglich. Häm, als Cofaktor beim Sauerstofftransport, hat eine kontinuierliche Evolution der Tiere ermöglicht.

Der Biosyntheseweg zum Häm ist auch biomedizinisch relevant, da genetische Defekte oder chemisch induzierte Inhibition der Expression von Genen des Biosyntheseweges, bei höheren Tieren und dem Menschen in Krankheiten resultieren, die allgemein unter Porphyrien zusammengefaßt werden. Dahinter verbergen sich für jeden enzymatischen Schritt unterschiedliche



Krankheitsbilder. Hypothesen besagen, daß extreme Erscheinungsbilder dieser Krankheiten bei manchen Menschen, wie Blutarmut, Lichtempfindlichkeit oder starker Haarwuchs, Ursache für Legenden über Vampirismus und Werwölfe seien (Moore, 1990).



**Abb. 1:** Übersicht über die Häm-Biosynthese. Benannt sind die für die einzelnen Schritte relevanten Enzyme. In Klammern sind bekannte, zugehörige Gene bakteriellen Ursprungs genannt. A, Acetatgruppe; P, Propionatgruppe; M, Methylgruppe; 'gen, porphyrinogen.

Die Bildung des gemeinsamen Vorläufermoleküls aller Tetrapyrrole, der 5-Aminolevulinat (ALA), erfolgt in der Natur auf zwei Wegen. In Tieren, Pilzen und der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien besteht dieser Schritt aus der Kondensation von Glycin mit Succinyl-CoA unter Bildung von ALA und CO<sub>2</sub>. Dieser Schritt wird durch die ALA Synthase (ALAS) katalysiert, einem Homodimer mit Pyridoxalphosphat als Cofaktor (Jordan, 1991).

In Pflanzen, Archaea und den meisten Bakterien wird ALA aus dem C<sub>5</sub>-Gerüst des Glutamats in zwei Reaktionsschritten gebildet (Jahn *et al.*, 1992). Im ersten Schritt reduziert die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR, kodiert durch *hemA*) tRNA<sup>Glu</sup>-gebundenes Glutamat (Glutamyl-tRNA) unter Verbrauch von NADPH zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA). Der katalytische Mechanismus der GluTR aus *Methanopyrus kandleri* wurde kürzlich in unserem Labor geklärt und ihre Kristallstruktur ist in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Dirk Heinz (GBF Braun-

schweig) gelöst worden (Moser *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2001). Die GluTR, liegt als Homodimer vor und besitzt einen für die katalytische Aktivität relevanten Aminosäurerest: Cys48. Die  $\alpha$ -Carboxyl-Gruppe der Glutamyl-tRNA wird durch die Sulfhydrylgruppe des Cys48 nukleophil angegriffen, so daß intermediär ein Glutamyl-Thioester unter Abspaltung der tRNA entsteht. Durch das NADPH wird der Glutamyl-Thioester zu GSA. Das zweite Enzym des C<sub>5</sub>-Weges ist die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase (GSAM), die GSA, unter Beteiligung des Cofaktors Pyridoxalphosphat, zu ALA transaminiert (Ilag & Jahn, 1991). Auffällig ist die ungewöhnliche V-förmige Struktur der GluTR, die zur Postulierung eines trimeren GluTR-Glutamyl-tRNA-GSAM-Komplexes führte.

Im nächsten Schritt der Häm-Biosynthese erfolgt die Kondensation zweier ALA-Moleküle unter Bildung des Pyrrols Porphobilinogen (PBG). Diese Reaktion wird von der PBG Synthase (PBGS) katalysiert (Frankenberg *et al.*, 1999 a, b, c). In der PBGS existieren dazu zwei Substrat-Bindungsstellen pro aktivem Zentrum. Die P-Seite, so benannt weil aus dem hier gebundenen ALA Molekül der Propionatrest des späteren Pyrrolrings hervorgeht, bindet das erste Molekül ALA über eine Schiff-Base. Die A-Seite, weil aus dem hier gebundenen ALA-Molekül der Acetatrest hervorgeht, bindet das zweite Molekül ALA. Die PBGS ist ein homooktamer Enzym, welches unterschiedliche Metallionen mit verschiedenen Funktionen enthält. Die Art der Zusammensetzung der Metallionen ist von Organismus zu Organismus verschieden. In höheren Tieren und Hefe liegen acht Zinkionen im Enzym vor, wohingegen in *E. coli* und vielen anderen Bakterien acht Zn- und acht Mg-Ionen im Enzym vorhanden sind. Dahingegen enthalten die PBGS aus den *Rhodobacter* Spezies, Algen und Pflanzen 16 Mg-Ionen. Die Koordination der Metalle erfolgt über Histidin-, Cystein-, Aspartat- und Glutamatreste. Die Funktionen und Positionen aller Metallionen in den PBGS konnten bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Es konnten aber drei unterschiedliche Metallbindestellen identifiziert werden. Für das Enzym aus *Pseudomonas aeruginosa* liegen kristallographische Daten aus unserem Labor in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Dirk Heinz (GBF Braunschweig) vor. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit konnte die Funktion der Magnesiumionen aufgeklärt werden. Die PBGS aus *P. aeruginosa* arbeitet metallunabhängig in Bezug auf die eigentliche Katalyse. Die Magnesiumionen sind trotzdem katalytisch relevant, da durch deren An- bzw. Abwesenheit der Zugang zum katalytischen Zentrum geschlossen bzw. geöffnet.

Der nächste Schritt in der Häm-Biosynthese stellt die Kondensation von vier Molekülen PBG zum linearen Tetrapyrrol Prä-Uroporphyrinogen, auch Hydroxymethylbilan genannt, dar. Katalysiert wird die Reaktion durch die PBG Deaminase (PBGD) (Warren *et al.*, 1988; Louie *et al.*, 1992). Die PBGD Struktur aus *E. coli* zeigte ein monomeres Enzym, das aus drei  $\alpha/\beta$ -

Domänen besteht. Domäne 1 und 2 bestehen aus einem fünfsträngigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt und sie bilden das aktive Zentrum. Domäne 3 besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und es bindet kovalent einen ungewöhnlichen Cofaktor (Louie *et al.*, 1996). Der Cofaktor besteht aus zwei Substratmolekülen und wird vom Enzym eigenständig synthetisiert. Im ersten katalytischen Zyklus bindet das PBGD Apoprotein sechs PBG Moleküle als Hexapyrrol, bevor es das terminale Tetrapyrrol freisetzt. Zurück bleibt ein an die PBGD gebundenes Dipyrrol und damit das Holoenzym. Würde das lineare Tetrapyrrol freigesetzt, würde es spontan zum völlig symmetrischen Uroporphyrinogen I zyklisieren. Durch Bindung des Moleküls an die Uroporphyrinogen III Synthase erfolgt sofort die Umsetzung des linearen Tetrapyrrols zum asymmetrischen Uroporphyrinogen III. In dieser ungewöhnlichen Reaktion wird erst ein Pyrrolring (Ring D) gedreht bevor die Zyklisierung erfolgt, was einem Mechanismus mit Spirolactam-Zwischenprodukt beinhaltet.

Uroporphyrinogen Decarboxylase (UroD) katalysiert die schrittweise Decarboxylierung der vier Acetat-Seitenketten zu Methylgruppen. UroD kann dabei beide Isomere, I und III, umsetzen und es benötigt dafür keine Cofaktoren. Die Struktur der menschlichen UroD konnte von Whitby *et al.*, 1998 aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, daß die UroD Dimere bildet, wobei jedes Monomer ein aktives Zentrum besitzt und aus nur einer Domäne besteht. Diese Domäne besteht aus einem  $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel mit einem aktiven Zentrum, das von Loops der C-terminalen Enden der  $\beta$ -Stränge gebildet wird. In diesem aktiven Zentrum befinden sich zahlreiche positiv geladene Aminosäurereste, die vermutlich an der Substratfixierung beteiligt sind. Defekte an der UroD führt zum Auftreten spontaner Porphyria cutanea tarda (PCT) und Hämochromatosis. Hepatischer Eisenüberschuß könnte *in vivo* zu einer Inaktivierung von UroD führen, obwohl Eisen *in vitro* keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat.

Coproporphyrinogen III, aber nicht das Isomer I, wird enzymatisch oxidativ decarboxyliert zu Protoporphyrinogen IX. Katalysiert wird diese Reaktion durch Coproporphyrinogen III Oxidasen (CPO). Hier befindet sich einer von zwei zentral auf Transkriptionsebene regulierten Schritten der Häm-Biosynthese in vielen Organismen.

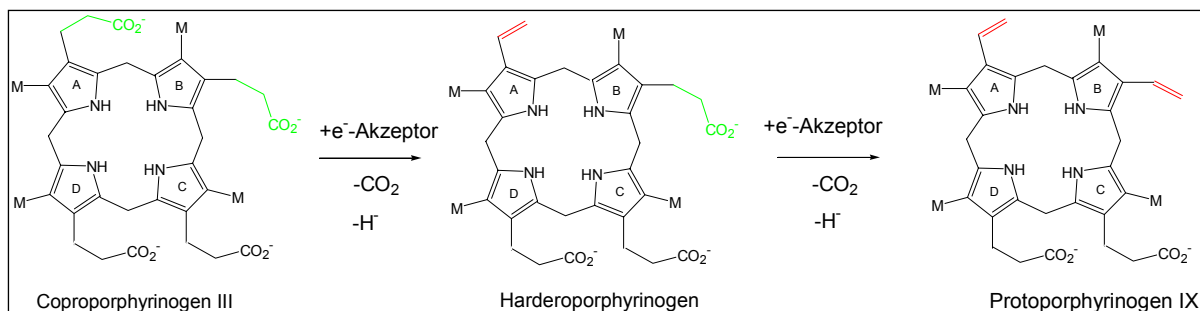
Der nächste Schritt ist die Umwandlung von Protoporphyrinogen IX in Protoporphyrin IX (Dailey *et al.*, 1996). Bei dieser Oxidation werden sechs Elektronen übertragen, so daß ein vollständig konjugiertes Ringsystem im Tetrapyrrol entsteht. Diese Reaktion wird in allen Eukaryonten und wenigen Prokaryonten durch die homodimere, FAD-enthaltende, Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) katalysiert, die an die innere mitochondriale Membran in Eukaryonten und an die cytoplasmatische Membran von Bakterien assoziiert vorliegt. Das Enzym benötigt für die Reaktion drei Sauerstoffmoleküle, die zu Wasserstoffperoxid reduziert werden. Mutationen in

der PPO führen zu der am besten charakterisierten Porphyrin, der Porphyrin variegata. Das Enzym ist auch für die Agrochemie interessant, weil Diphenyl-Ether enthaltende Herbizide hochspezifisch diese PPO inhibieren (Matringe *et al.*, 1989). Die Entdeckung einer herbizid-resistenten PPO aus *Bacillus subtilis* ergab die Möglichkeit herbizid-resistente Formen von PPO genetisch in industriell genutzte Kulturpflanzen einzubringen (Dailey *et al.*, 1994). In anaeroben und fakultativ anaeroben Organismen wird der von der PPO katalysierte Schritt von einem Multiproteinkomplex ausgeführt, der Anschluß an die Respirationskette hat (Klemm *et al.*, 1987). Genetische und molekulare Untersuchungen identifiziert bisher zwei mögliche Untereinheiten dieses Enzym-Komplexes (*hemG* und *hemK*). Der Nachweis gelang, daß HemG in *Escherichia coli* ein Teil des Enzymsystems ist (Sasarmann *et al.*, 1993). Allerdings wurde nur noch in *Salmonella typhimurium* ein *hemG*-Analog gefunden, so daß über eine *Enterobacteriaceae*-spezifische Elektronenübertragungsfunktion für dieses kleine Protein spekuliert wird. HemK kommt auch in Organismen vor, die kein Häm produzieren und keines der anderen Hämbiosyntheseenzyme besitzen. Weiterhin konnte für Hefe die Beteiligung von HemK an der Hämbiosynthese ausgeschlossen und die Funktion als Methyltransferase nachgewiesen werden (Le Guen *et al.*, 1999).

Im letzten Schritt der Häm-Biosynthese katalysiert die Ferrochelatase die Insertion von Eisen in Protoporphyrin IX unter Bildung von Häm (Protohäm IX). Mit Ausnahme des Enzyms aus *B. subtilis* sind die bisher untersuchten Ferrochelatasen membran-assoziierte Proteine. Ferrochelatase katalysiert die Insertion von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und abhängig vom Organismus auch von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  in eine Reihe von IX-Isomer Porphyrinen, wie z.B. Proto-, Hemato-, Meso- und Deuteroporphyrin. Aus biochemischen Untersuchungen und aus Proteinkristallstrukturen (Burden *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001) ist bekannt, daß das Enzym zuerst das Metallion und danach das Porphyrin-Substrat bindet (Hansson *et al.*, 1995; Dailey *et al.*, 1989; Gora *et al.*, 1996; Kohno *et al.*, 1994). Die Metallinsertion erfolgt, sobald das an sich planare Porphyrin vom Enzym gekrümmt wird. Wenn das Häm gebildet wurde, erfolgt eine Replanarisierung und schließlich die Freisetzung des Produktes. Ferrochelatase von höheren Tieren enthält einen  $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster, im Gegensatz zu prokaryontischen Enzymen, die keinen  $[\text{FeS}]$ -Cluster enthalten. Für das menschliche Enzym konnte gezeigt werden, daß drei der vier Liganden des Clusters Cysteinreste sind. Außerdem ist ein in allen Eukaryonten konservierter Histidinrest in die Eisen-Ligation involviert.

### 1.3 Coproporphyrinogen III Oxidasen

Coproporphyrinogen III Oxidasen katalysieren die Umsetzung von Coproporphyrinogen III (Coprogen) zu Protoporphyrinogen IX (Protopogen) (Abb. 2). Bei dieser Reaktion werden in einer oxidativen Decarboxylierung die Propionat-Gruppen an den Ringen A und B des Tetrapyrrols zu Vinyl-Gruppen umgesetzt. Der Mechanismus verläuft über eine antiperiplanare Eliminierung, gepaart mit der Abstraktion des *si*-Wasserstoffatoms in  $\beta$ -Position zur Propionat-Gruppe in Form eines Hydrids (Seehra *et al.*, 1983). Diese Freisetzung eines Hydrids zeigt die Notwendigkeit eines Elektronenakzeptors. Zuerst wird die Propionat-Gruppe des A-Rings umgesetzt und danach die des B-Rings, wobei das Zwischenprodukt (Harderoporphyrynogen) isolierbar ist (Jackson *et al.*, 1980). Diese enzymatisch katalysierte Reaktion wurde den Genprodukten von *hemF*, *hemN* und *hemZ* zugeschrieben (Troup *et al.*, 1994; Troup *et al.*, 1995; Homuth *et al.*, 1999). Dabei galt HemF als sauerstoffabhängiges und HemN bzw. HemZ als sauerstoffunabhängige Enzyme. Die drei CPOs weisen nur geringe Aminosäuresequenzhomologien auf.



**Abb. 2:** Die von den CPOs katalysierte Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX. M, Methylgruppe.

#### 1.3.1 Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase HemN

Erst kürzlich konnte in unserem Labor gezeigt werden, daß das *E. coli hemN*-Genprodukt CPO-Aktivität besitzt (Verfürth, 1999; Layer, 2001). Das Enzym ist ein Monomer und enthält ein [4Fe-4S]-Zentrum. Es benötigt für seine katalytische Aktivität ein weiteres cytoplasmatisches Protein, SAM und NADH. HemN zeigt einen sauerstoffempfindlichen Absorptionspeak bei 410 nm, was typisch ist für [4Fe-4S]-Proteine. Mittels Mutagenese-Studien konnten die drei Cysteinreste, die das Fe-S-Zentrum bilden, identifiziert werden. Drei Cysteinreste (C62, C66, C69) bilden das Aminosäuresequenzmotiv CxxxCxxC, das sich auch in HemZ befindet. HemN

gehört aufgrund dieses Motivs und seines Cofaktors SAM zu einer neuen Klasse von Fe-S-Proteinen. Zusätzlich konnte ein weiterer für die enzymatische Aktivität relevanter Cysteinrest (C71) identifiziert werden. Die Mutation dieses Cysteinrestes inaktiviert das Enzym, ohne daß das Fe-S-Zentrum zerstört wird.

### 1.3.2 Die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase HemF

Bisher wurden ausschließlich eukaryontische CPOs untersucht, die als Homodimer vorliegen und im intermitochondrialen Membran-Raum lokalisiert sind (Elder *et al.*, 1978; Grandchamp *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 1993). Evolutionär gesehen ist HemF ein eukaryontisches Enzym, da alle Eukaryonten es besitzen und nur einige wenige Bakterien. Die Aminosäuresequenzhomologien zwischen allen bekannten HemF aus Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien sind ungewöhnlich groß, etwa bei 70-90 %. Zu anderen Enzymen weist HemF keine markanten Homologien auf. Bisherige enzymatische Untersuchungen zeigten die Notwendigkeit von Sauerstoff für die katalysierte Reaktion. Cofaktoren wurden weitgehend ausgeschlossen. Es existieren allerdings verschiedene, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse über den Metallgehalt in HemF. So wurde Kupfer in rekombinantem HemF aus der Maus (Kohno *et al.*, 1996) nachgewiesen, Eisen in nativem HemF aus Hefe (Labbe *et al.*, 1985; Labbe, 1997) und kein Metall in rekombinantem humanem HemF (Medlock, 1996). Allerdings konnte nie ein Einfluß von Metallionen auf die Enzymaktivität experimentell gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hohen Sequenzhomologien zwischen den Enzymen aus verschiedenen Organismen. Der Einsatz von Aminosäuremodifikationsreagenzien deutete darauf hin, daß Tyrosinresten an der Katalyse beteiligt sind (Yoshinaga *et al.*, 1980a). Mutagenese-Studien zeigten die Bedeutung des hochkonservierten His158-Restes im Maus HemF für die enzymatische Aktivität (Kohno *et al.*, 1996). Die  $K_m$ -Werte von HemF für das Substrat Coprogen variieren zwischen 0.05  $\mu\text{M}$  für das Enzym aus Hefe (Camadro *et al.*, 1986) und 48  $\mu\text{M}$  für HemF aus Rind (Yoshinaga *et al.*, 1980b). Diese großen Unterschiede wurden auf die unterschiedlichen Systeme von enzymatischen Aktivitätstests zurückgeführt. Die enzymatische Aktivität aller getesteten HemF läßt sich mit nicht-ionischen Detergenzien steigern (Yoshinaga *et al.*, 1980b). Heterogene Ergebnisse wurden bei Untersuchungen der inhibitorischen Wirkung von Metall-Chelatoren und Proto gefunden. Es gab Hinweise auf die Bildung von Wasserstoffperoxid bei der katalysierten Reaktion (Labbe, 1997). Das pH-Optimum der enzymatischen Aktivität liegt bei den eukaryontischen HemF zwischen 7.2 und 8.6. Gegenstand zahlreicher Diskussionen ist die Frage nach dem enzymatischen Mechanismus und wie der benötigte molekulare Sauerstoff am Enzym gebunden

wird, was nach bisherigen Erkenntnissen in der Natur ausschließlich durch Metallionen, wie Cu, Fe, Mo und Mn, vermittelt wird.

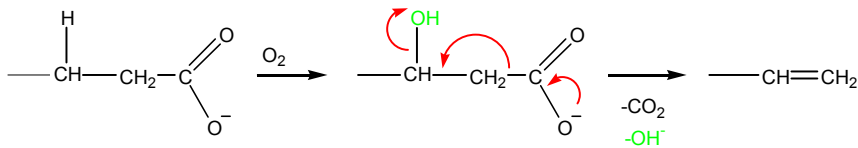
### 1.3.3 Postulierte Mechanismen für die katalysierte Reaktion der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF)

Die formale Abspaltung eines Hydrids während der enzymatischen Reaktion schließt Acrylsäure oder  $\beta$ -Oxosäure als Zwischenprodukt aus. Bisher wurden drei unterschiedliche Mechanismen postuliert, aber nicht bewiesen (Akhtar, 1994). In Mechanismus 1 wird das Substrat zunächst durch eine  $\beta$ -Hydroxylierung der Propionatseitenketten für den darauf folgenden Eliminierungsprozess aktiviert. Dieser von Yoshigana & Sano postulierte Mechanismus basiert auf ihren Beobachtungen, das HemF unter anaeroben Bedingungen das Substratanalogon 3-( $\beta$ -hydroxypropionat)-8-propionat Porphyrinogen IX umsetzen kann (Akhtar, 1994), sowie auf dem Nachweis, daß das mittels des tyrosinspezifischen Modifikationsreagenz Tetranitromethan inaktivierte Enzym in Gegenwart des 2,4-bis-( $\beta$ -hydroxypropionat) Porphyrinogen IX aktiv ist (Yoshinaga & Sano, 1980a). Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, daß ein oder mehrere Tyrosinreste an der Hydroxylierungsreaktion beteiligt sind. Bei diesem Mechanismus ergibt sich allerdings das Dilemma, daß neben Sauerstoff auch noch formal ein Hydridäquivalent zur Bildung des Hydroxids benötigt wird. Es gab bisher aber keinen Hinweis auf das notwendige Vorhandensein eines Reduktionsmittels während der katalysierten Reaktion.

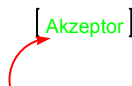
Beim vorgeschlagenen Mechanismus 2 erfolgt die Vinylbildung durch eine simultane Decarboxylierung und Hydridabstraktion, wobei der Elektronenakzeptor die Reaktionsabfolge auslöst. Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus liegt bei der Bildung terminaler Olefine vor, ausgehend von gesättigten Fettsäuren in höheren Pflanzen. Dann jedoch wäre das Vorhandensein eines Carboxylradikals und Eisens notwendig (Görge *et al.*, 1989).

Mechanismus 3 stellt eine zweistufige Variante von Mechanismus 2 dar, in der zunächst die Hydridabstraktion, unterstützt durch das vinyloge Stickstoffatom des Pyrrolringes, erfolgt. Dieser Vorgang folgt dem allgemeinen Gesetz, daß Elektronenverschiebungen schneller von statten gehen als der folgende Decarboxylierungsprozess. Das positiv geladene Stickstoffatom des Pyrrolringes erleichtert nun durch seinen Elektronenzug die Decarboxylierungsreaktion. Mechanismus 3 erlaubt außerdem ebenfalls die Bildung einer  $\beta$ -hydroxylierten Propionatseitenkette, indem am Michael-Akzeptor eine Wasseraddition erfolgen kann. Eine ähnliche Reaktionsabfolge findet sich bei der Bildung der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA Derivate im Rahmen der Fettsäureoxidation.

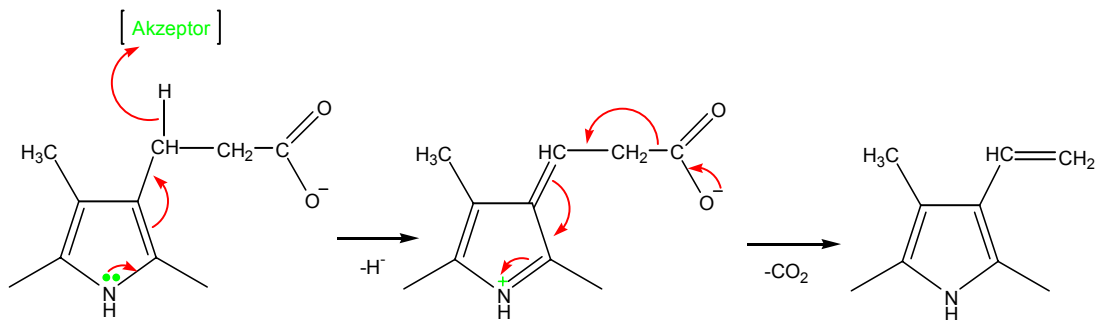
### Mechanismus 1:



### Mechanismus 2:



### Mechanismus 3:



## 1.4 Die Bindung von Sauerstoff in Mangan-haltigen Enzymen

Im vorigen Kapitel wurde dargelegt, daß Sauerstoff für die enzymatische Reaktion von HemF notwendig ist. Da im Ergebnisteil der Beweis für die Existenz von Mangan in HemF erfolgt, soll in diesem Kapitel die wahrscheinliche Funktion des Mangans, nämlich die Koordinierung von Sauerstoff, an ausgewählten Beispielen in der Natur dargestellt werden.

Mangan ist eines der Übergangsmetalle der vierten Periode, die in biologischen Systemen zahlreiche metabolische und strukturelle Funktionen übernehmen. In Proteinen werden Mangationen zur Unterstützung der Proteinfaltung, als Cofaktor bei der Katalyse von Reaktionen, wie Hydrolyse, Redox-Reaktionen und als Lewis Säure, eingesetzt. In Proteinen kommt Mangan in den physiologisch relevanten Oxidationsstufen +II, +III, +IV und +V vor. Die Koordination des Mangans erfolgt durch Sauerstoff- und Stickstoffdonoratome des Proteins. Die mögliche Koordinationszahl beträgt dabei 4, 5 und vor allem 6. Paramagnetische Zentren bilden folgende

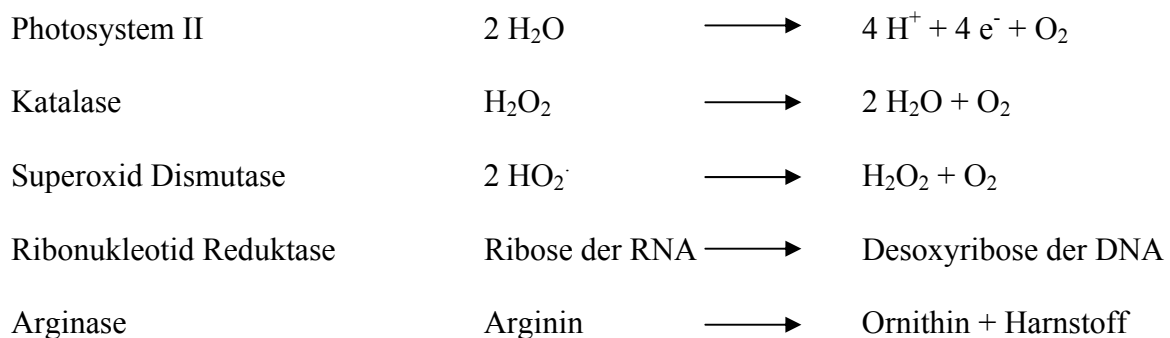


Elektronenkonfigurationen (Wieghardt, 1989):  $\text{Mn}^{\text{II}}$  mit  $d^5$ -high-spin (fünf ungepaarte Elektronen),  $\text{Mn}^{\text{III}}$  mit  $d^4$ -high-spin (vier ungepaarte Elektronen),  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  mit  $d^3$ -high-spin (drei ungepaarte Elektronen) und  $\text{Mn}^{\text{V}}$  mit  $d^2$ -high-spin (zwei ungepaarte Elektronen). Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften eignen sich Mangan-Komplexe für verschiedenste spektroskopische Untersuchungen (Tabelle 1).

**Tab. 1:** Darstellung der primär genutzten physikalischen Methoden zur Untersuchung von Mangan-Proteinen. In der linken Spalte sind die Methoden aufgelistet. In der rechten Spalte befinden sich die hauptsächlich zu erhaltenen Informationen bei Anwendung der jeweiligen Methode. ESR, Elektronenspinresonanz-Spektroskopie; CT, Charge-Transfer; EXAFS, extended X-ray absorption fine structure; MCD, magnetic circular dichroism; XANES, X-ray absorption near edge structure.

Methode	Anwendung
ESR	$\text{Mn}^{\text{II}}$ oder gemischtvalente Komplexe
UV/VIS-Spektroskopie	$\text{Mn}^{\text{III}}$ - und $\text{Mn}^{\text{IV}}$ -Komplexe (CT)
MCD	Mn-Nachweis und Mn-Mn-Kopplungen
Resonanz-Raman-Spektroskopie	Mn-Liganden-Kopplungen
Röntgenabsorptions-Spektroskopie (EXAFS / XANES)	Mn-Nachweis und Mn-Liganden-Kopplungen

Eine zentrale biochemische Reaktion im aeroben Leben dieser Erde ist die durch sichtbares Licht getriebene Oxidation von Wasser. Der enzymatische Apparat für diese Reaktion enthält ein manganhaltiges aktives Zentrum, an dem koordinierte Wassermoleküle zu Sauerstoff oxidiert werden (Hoganson *et al.*, 2000). Einige weitere repräsentative Reaktionen, die von Manganhaltigen Proteinen katalysiert werden, sind hier kurz aufgelistet:



Hydrolasen enthalten ein binukleares Mangan-Zentrum. Die bekanntesten Vertreter dieser Enzym-Klasse sind: Arginase, Ribonuklease H und Concanavalin A. Mangan enthaltende Redox-Enzyme besitzen mono-, bi- und tetranukleare Zentren (Tab. 2).

**Tab. 2:** Die bisher nachgewiesenen Mangan-Zentren in Redox-Proteinen. PS II, Photosystem II.

Art des Mangan-Zentrums	Protein
mononuklear	Mangan-Superoxid-Dismutase
	Mangan-Peroxidase
	Mangan-Dioxygenase
binuklear	Katalase
	Mangan-Ribonukleotid Reduktase
tetranuklear	Wasserspaltender Komplex von PS II

Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) katalysiert die Umsetzung von Superoxid zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Das Enzym ist ein Homodimer oder Homotetramer, das ein Manganion pro Monomer enthält. Das Mangan wird trigonal-bipyramidalen von drei Histidin-, einem Aspartatrest und einem Wasser- oder Hydroxidmolekül koordiniert (Whittaker, 2000). Dabei bilden zwei Histidin- und der Aspartatrest die äquatoriale Ebene des Komplexes. Das Mangan wechselt bei der Katalyse zwischen den Oxidationsstufen II und III und das  $Mn^{III}$  bindet während des Reaktionszyklus molekularen Sauerstoff als "dead-end"-Komplex (Abb. 3).

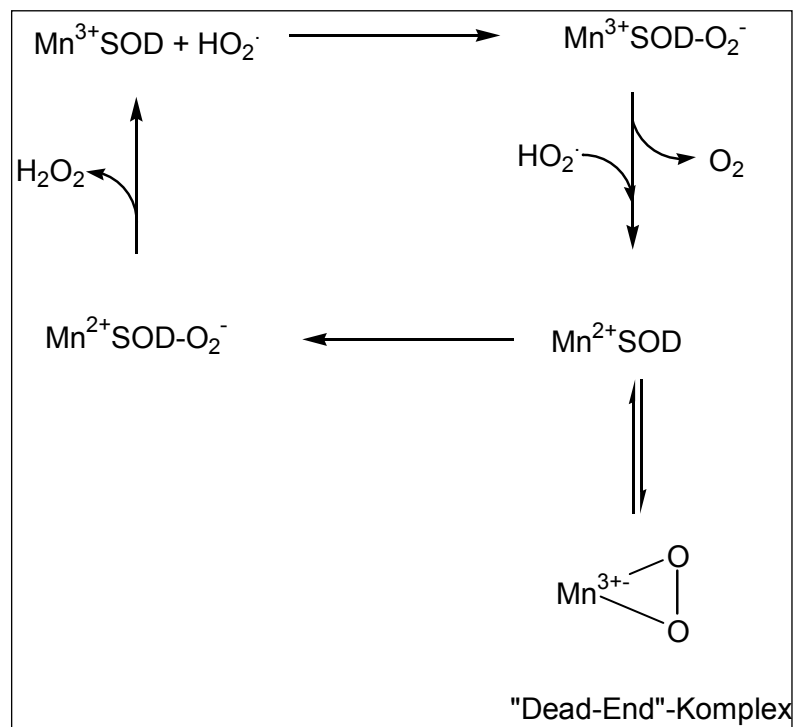


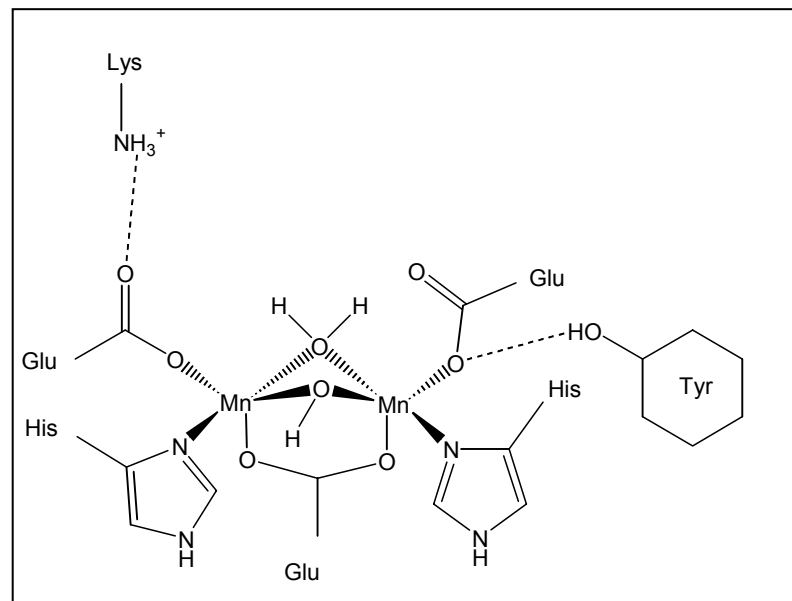
Abb. 3: Schema des von der Superoxid-Dismutase durchgeführten Reaktionsmechanismus.

Mangan Peroxidase (MnP) katalysiert die ein-Elektronen Oxidation von Lignin. Dabei wird Häm als Cofaktor benötigt, welches das am Enzym gebundene  $\text{Mn}^{\text{II}}$  zu  $\text{Mn}^{\text{III}}$  oxidiert (Wariishi *et al.*, 1988). Das  $\text{Mn}^{\text{II}}$  wird von den Carboxyl-Gruppen der zwei Propionatgruppen am Häm und über zwei Glutamat- und einem Aspartatrest am Enzym gebunden (Kishi *et al.*, 1997). Das gebildete  $\text{Mn}^{\text{III}}$  diffundiert dann weg vom Enzym zum Lignin-Polymer, wo dann die Lignin-Oxidation erfolgt. Kleinere Moleküle, wie Oxalat, Lactonsäure oder Malonsäure stabilisieren das  $\text{Mn}^{\text{III}}$  während der Diffusion zum Lignin und verhindern so eine Disproportionierung des Metalions. Am Lignin führt das  $\text{Mn}^{\text{III}}$  zu einer Radikalbildung.

Die Umwandlung von RNA in DNA wird u.a. durch die Mangan Ribonukleotid Reduktase (MnRR) katalysiert. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten (R1 und R2) und einem binuklearen Mangan-Zentrum, wobei die beiden Manganionen von einem Aspartat-, zwei Histidin-, drei Glutamatresten und einem Wassermolekül koordiniert werden (Atta *et al.*, 1992). Während der Katalyse wird eines, die beiden Manganionen verbrückendes,  $\mu$ -oxo-Mn Motiv gebildet. Es kommt außerdem zur Bildung eines Tyrosin-Radikals, allerdings besitzt dieses Radikal eine relativ kurze Halbwertszeit von 1.5 Stunden. Hydroxyharnstoff inaktiviert die MnRR, weil das Tyrosin-Radikal dadurch ausgelöscht wird.

Katalase enthält Mangan, das mit molekularem Sauerstoff, oder Peroxid, interagiert. Das Enzym katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem

Sauerstoff. Das aktive Zentrum der Katalase aus *Thermus thermophilus* ist in Abb. 4 dargestellt. Die beiden Manganionen werden von folgenden Liganden verbrückt: einem Oxo,  $\mu\text{-O}^{2-}$  und einem Carboxylat-Liganden. Die Koordinationsgeometrie entspricht einer quadratischen Pyramide. Das Enzym ist ein Homohexamer, wobei sich das binukleare Mangan-Zentrum in einem Bündel von vier  $\alpha$ -Helices befindet (Yoder *et al.*, 2000). Der Oxidationszustand der Manganionen wechselt während der katalytischen Reaktion von II zu III in zwei 2-Elektronen Reaktionen.



**Abb. 4:** Schematische Illustration des aktiven Zentrums der Katalase aus *T. thermophilus*. Dargestellt ist die Koordination des binuklearen Mangan-Zentrums bei Anwesenheit zweier Lösungsmittel-Moleküle als Hydroxid und Wasser.

Die Identifizierung von Proteinen als manganhaltig war in der Vergangenheit mit verschiedenen Problemen behaftet.  $\text{Mn}^{\text{II}}$ -Ionen sind kinetisch labil und die Stabilitätskonstanten der Bindungen sind oft recht klein. Aus diesem Grund werden während einer Proteinreinigungszedur häufig  $\text{Mn}^{\text{II}}$ -Ionen ausgewaschen oder durch andere zweiwertige Kationen, die aus verwendeten Chemikalien stammen, substituiert. Die Redoxpotentiale der komplexgebundenen Mangan-Ionen in den Oxidationsstufen +II, +III und +IV liegen oft relativ nahe beieinander, d.h. während der Isolierung des Proteins sind ungewollt Wechsel der Oxidationsstufen möglich, so daß ein vorher inertes Mn-Ion höherer Oxidationsstufe zu  $\text{Mn}^{\text{II}}$  wird (mit den vorher erwähnten Problemen). Das gleiche Problem tritt bei zweikernigen Mangankomplexen auf, da diese zu pH-abhängigen Disproportionierungen neigen, wobei wiederum  $\text{Mn}^{\text{II}}$  gebildet werden kann (Sugiura *et al.*, 1981; Hefler *et al.*, 1987; Wieghardt, 1989).

---

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisher wurden ausschließlich eukaryontische HemF untersucht. Die Charakterisierung dieser Enzyme führte zu sehr unterschiedlichen, zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Enzymmechanismus und einer Metallbeteiligung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum ersten Mal ein prokaryontisches HemF rekombinant hergestellt, ein Proteinreinigungsprotokoll, sowie ein Aktivitätstest-System etabliert werden. Eine ausführliche biophysikalische Charakterisierung sollte offene Fragen zur potentiellen Funktion von Metallen und des Sauerstoff für die Enzymkatalyse beantworten helfen. Ein Enzymmechanismus sollte abgeleitet werden. Mutagenese-Studien sollten helfen Postulate zur Enzymkatalyse strukturell zu untermauern. Unter der Voraussetzung einer mengenmäßig genügenden Proteinproduktion, sollte mit der Proteinkristallisation als Basis für eine Strukturaufklärung begonnen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Abkürzungen

$A_\lambda$	Absorption bei der Wellenlänge $\lambda$ in nm
AAS	Atomabsorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CBP	Calmodulinbindungspeptid
CD	Circular Dichroism (Zirkulardichroismus)
Copro	Coproporphyrin III
Coprogen	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III Oxidasen
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
fw	forward (vorwärts)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$M_r$	relative molekulare Masse
MCD	Magnetic Circular Dichroism (magnetischer Zirkulardichroismus)
$NAD^+$	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
rpm	Umdrehungen pro Minute
$OD_\lambda$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda$ nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Proto	Protoporphyrin IX
Protoen	Protoporphyrinogen IX
PSI	Pounds per square inch
rev	reverse (rückwärts)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	$N,N,N',N'$ -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

---

UV / VIS	Ultravioletter- und sichtbarer Bereich des Lichtes
v/v	Volumenanteil pro Volumen
W7	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalen Sulfonamid HCl
WT	Wild-Typ
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
XANES	X-ray absorption near edge structure

## 2.2 Geräte und Chemikalien

Geräte		
AAS	Spectrometer 3100	Perkin Elmer
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	GNA 100	Pharmacia
Autoklav	Varioklav	H+P-
Labortechnik		
Blottingapparatur	Trans-Blot SD	BioRad
CD-Spektrometer	J-810	JASCO
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BioRad
FPLC	Äkta purifier	Pharmacia
French Press	French <sup>R</sup> Pressure Cell	SLM Aminco
HPLC	HPLC System	JASCO
Lumineszenzspektrometer	LS50B	Perkin Elmer
pH-Messgerät	pH-Meter C 6840 B	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protean II	BioRad
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc
Thermocycler	PTC-200	MJ-Research
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallgerät	UW 2070	Bandelin
UV/VIS-Spektrometer	Lambda 2	Perkin Elmer
Videodokumentationsanlage	Chemidoc	BioRad
Waagen	SBA 52	Mettler
	HC 52	Infoors Hat
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
	Centrifuge 5403 C	Eppendorf
	RC 5B Plus	Sorvall
	L8 70M Ultrazentrifuge	Beckmann
	Speedvac Concentrator	Savant

### 2.2.1 Chemikalien und Kits

Aminosäuremodifikationsreagenzien	Sigma
Calmodulin Affinitätschromatographiematerial	Stratagene

Centricon-10, Centriprep	Amicon
Markerproteine für SDS-PAGE	Sigma
DNA-Isolierungssäulen	Quiagen
Kulturmedien	Difco
Molekularbiologische Enzyme	Amersham
Oligonucleotide	MWG Biotech
QuikChange™ Mutagenesis Kit	Stratagene
Sterilfilter	Millipore

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen und in der Qualität *p. a.* benutzt : Fluka, Gerbu, J.T.Baker, Merck, Roth und Sigma.

## 2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

**Tab. 3:** Übersicht über die verwendeten Bakterien und Plasmide.

<u>Escherichia coli</u> Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F <sup>-</sup> 1 <sup>sup</sup> E44D( <i>argF-lac</i> ) U169 j80 <i>dlacZ</i> M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BL21(λDE3)	F <sup>-</sup> <i>ompZ r<sup>m</sup> λ<sub>lys</sub>PlacUV5-T7-GenlPlac<sup>q</sup>-lacI</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
<u>Plasmid</u>	Beschreibung	Quelle
pCAL-n	Expressionsvektor mit dem Gen des Calmodulinbindungspeptids für N-terminale Proteinfusionen, sowie DNA kodierend für eine Thrombinschnittstelle	Stratagene
pCAL <i>hemF</i>	pCAL-n-Derivat, kodiert N-terminale Fusion von CBP mit HemF aus <i>E.coli</i> , getrennt durch die Thrombinschnittstelle	diese Arbeit



Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCALhemFH96L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (H96L) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemFH106L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (H106L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFH145L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (H145L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFH175L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (H175L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFY135F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y135F) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFY160F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y160F) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFY179F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y179F) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFY213F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y213F) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemFY240F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y240F) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemFY276F	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (Y276F) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfW36L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W36L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfW123L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W123L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfW124R	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W124R) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemfW167L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W167L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfW274L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W274L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfW298L	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (W298L) kodiert.	Anselm Sauerwald
pCALhemfC167S	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (C167S) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemfG127V	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (G127V) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemfT132A	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (T132A) kodiert.	diese Arbeit
pCALhemfP133A	pCALhemF-Derivat, das einen Aminosäureaustausch in HemF (P133A) kodiert.	diese Arbeit

## 2.4 Puffer und Lösungen

### 2.4.1 Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH = 8.0)	40.0 mM
	EDTA	1.0 mM
Agarosegel	Agarose in TAE-Puffer	1.0 % (w/v)
Probenpuffer	Bromphenolblau	350.0 µM
	Xylen Cyanol FF	450.0 µM
	Orange G	0.25 % (w/v)
	Saccharose in Wasser	115.0 mM
Ethidiumbromidlösung	in Wasser	0.1 % (w/v)
Längenstandard	<i>Eco</i> 91I verdaute λ-DNA	0.5 mg/ml

### 2.4.2 DNA-Präparation

Puffer P1	Tris-HCl (pH = 8.0)	50.0 mM
	EDTA	10.0 mM
	RNase A	0.01 % (w/v)
Puffer P2	NaOH	200.0 mM
	SDS	1.0 % (w/v)
Puffer P3	Kaliumacetat (pH = 5.5) mit Essigsäure titriert	3.0 mM

### 2.4.3 Protein-Präparation

#### Puffer für die Affinitätschromatographie:

Bindungspuffer	Tris-HCl (pH 8.8)	50.0 mM
	NaCl	200.0 mM
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.0 mM
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 mM
	Imidazol	1.0 mM
	Triton X-100	0.1 % (w/v)
Elutionspuffer	Tris-NaOH (pH 8.0)	50.0 mM
	NaCl	1000.0 mM
	EGTA	10.0 mM
	Triton X-100	0.1 % (w/v)

Zellaufschlusspuffer	(siehe Bindungspuffer)	
Thrombin Spaltungspuffer	Tris-HCl (pH 8.8)	50.0 mM
	NaCl	20.0 mM
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.5 mM

Puffer für die FPLC-Reinigung:

GPC-Puffer	Natriumphosphat (pH 7.0)	50.0 mM
	NaCl	150.0 mM
	Glycerin	10.0 % (w/v)
MonoS-Bindungspuffer	MES / HCl (pH 6.0)	50.0 mM
MonoS-Elutionspuffer	MES / HCl (pH 6.0)	50.0 mM
	NaCl	1000.0 mM

#### 2.4.4 Enzymtest

Kinetikpuffer	MES / HCl (pH 6)	50.0 mM
	Triton X-100	0.1 % (w/v)
Coprogen-Lösung	Coprogen in Kinetikpuffer	0.4 mM
Stop-Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O	30.0 %

#### 2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	39.0 % (w/v)
	N,N'-Methylenbisacrylamid	1.0 % (w/v)
	in H <sub>2</sub> O	
Sammelgelpuffer	SDS	0.4 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 6.8)	1.5 % (w/v)
	in H <sub>2</sub> O	
Trenngelpuffer	SDS	0.4 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 8.8)	1500.0 mM
	in H <sub>2</sub> O	
APS-Lösung	Ammoniumperoxosulfat	10.0 % (w/v)
	in H <sub>2</sub> O	
Sammelgel	Acrylamid-Stammlösung	1.5 ml
(6 %ig (w/v), für 5 Minigele)	Sammelgelpuffer	2.5 ml
	deion. Wasser	6.0 ml
	TEMED	10.0 µl

	APS-Lösung	100.0 µl
Trenngel (12 %ig (w/v), für 5 Minigele)	Acrylamid-Stammlösung	6.0 ml
	Trenngelpuffer	5.0 ml
	deion. Wasser	9.0 ml
	TEMED	20.0 µl
	APS-Lösung	200.0 µl
Elektrophoresepuffer	Glycin	385.0 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 8.8) in H <sub>2</sub> O	50.0 mM
Probenpuffer	Glycerin	40.0 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	2.0 mM
	SDS	110.0 mM
	Bromphenolblau	3.0 mM
	Tris-HCl (pH = 6.8)	100.0 mM
Färbelösung	Essigsäure	10.0 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue-G-250 in H <sub>2</sub> O	1.0 g/l
Entfärbelösung	Ethanol	30.0 % (v/v)
	Eisessig	10.0 % (v/v)
	in H <sub>2</sub> O	
Dalton Marker VII	α-Lactalbumin	M <sub>r</sub> =14,200
	Trypsin Inhibitor	M <sub>r</sub> =20,100
	Trypsinogen	M <sub>r</sub> =24,000
	Carboanhydrase	M <sub>r</sub> =29,000
	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	M <sub>r</sub> =36,000
	Ovalbumin	M <sub>r</sub> =45,000
	Rinderserumalbumin	M <sub>r</sub> =66,000

## 2.4.6 Western Blotting

Blottingpuffer	Borsäure	3.09 g/l
	NaOH	1.0 N
	MeOH	20.0 %
Färbelösung	Ponceau Rot	0.2 %
	in Essigsäure	3.0 %

## 2.5 Kulturmedien und Medienzusätze

### 2.5.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde ausschließlich das Vollmedium Luria Bertani (LB) verwendet, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

LB-Medium	Hefe-Extrakt	10.0 g/l
	NaCl in Wasser	5.0 g/l
	Peptone	10.0 g/l
<u>MMA-Medium</u>	MMA-Lösung (10x)	100.0 ml/l
	MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1.0 ml/l
	Glucose (20 %ig)	10.0 ml/l
	Casaminoacid (0.25 %ig)	5.0 ml/l
	Thiamin (1 M)	1.0 ml/l
	Spurenelemente	10.0 ml/l
MMA-Lösung (10x)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	105.0 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	45.0 g/l
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0 g/l
	Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O	5.0 g/l
Spurenelemente	EDTA	2.5 g/l
	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	11.0 g/l
	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5.0 g/l
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1.8 g/l
	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.7 g/l
	BH <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	0.1 g/l
	NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1.3 g/l

### 2.5.2 Zusätze

Vom Antibiotikum Ampicillin und von IPTG wurden jeweils konzentrierte Stammlösungen angesetzt, steril filtriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugegeben. Ampicillin wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml und IPTG mit einer Endkonzentration von 0.1 mM benutzt.

Für Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zum in **2.5.1** beschriebenen LB-Medium gegeben.

Ampicillin-Stammlösung:	Ampicillin in Wasser	100.0 mg/ml
IPTG-Stammlösung:	IPTG in Wasser	1.0 M
Agar-Zusatz:	Agar-Agar	15.0 g/l

## **2.6 Mikrobiologische Techniken**

### **2.6.1 Sterilisation**

Alle Medien und Puffer wurden bei 121 °C für 20 min dampfsterilisiert. Temperatur-empfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters war 0.2 µm).

### **2.6.2 Wachstumsbedingungen**

*E. coli* DH5α und BL21(λDE3) Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in Reagenzgläsern kultiviert. Aerobe Bakterienkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm im Schikane-Kolben kultiviert. Inkubationszeiten bis zur Induktion mittels IPTG wurden abhängig von der Zelldichte variiert.

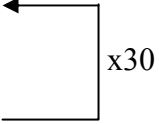
### **2.6.3 Bestimmung von Zelldichten**

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der OD bei 578 nm im Photometer bestimmt, bei Zelldichten mit einer  $OD_{578} \geq 1$  wurde eine 1:10-Verdünnung vermessen. Eine  $OD_{578}$  von 1 entspricht hierbei ca. einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^9$  Zellen pro ml.

## **2.7 Molekularbiologische Techniken**

### **2.7.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR-Technik**

Mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction)- Technik konnte das *hemF*-Gen direkt aus dem *E. coli*-Chromosom mit Standardmethoden (White, 1993) amplifiziert werden. Die PCR wurde in PCR-Reaktionsgefäßen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1)	5 min	95°C	
2)	1 min	95°C	
3)	1 min	45°C	
4)	1 min 30 sec	72°C	
5)	5 min	72°C	

Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden etwa 1 µg chromosomale *E. coli* DNA, 10 µl 10x-PCR-Puffer, je 20 pmol Primer, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 2.5 Units Taq-DNA-Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Um Verdunstung zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet.

#### Primer:

pET-Vektor:

fw 5'-AAA GCG ATA ACA TAT GAA ACC CGA C-3'

rev 5'-GCA TCA GCG GAT CCG GGA GT-3'

pGEX und pCal-Vektor:

fw 5'-GAA AAA GGG ATC CGT TAT GAA ACC-3'

rev 5'-AGC GGA TCC TCG AGT GGG GG-3'

#### Restriktion von DNA

Das Schneiden von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angabe der Vertreiberfirma. Die Inkubationsdauer bei 37°C betrug 2 h.

Restriktionsendonukleasen:	pET-Vektor	<i>NdeI</i> (fw) <i>BamHI</i> (rev)
	pGEX und pCal-Vektor	<i>BamHI</i> (fw) <i>XhoI</i> (rev)

#### Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase (1 Unit pro 10 µl Ansatz). Um ein DNA-Fragment (Insert) in einen passenden aufgeschnittenen Vektor zu ligieren, wurde der Vektor vorher mit SAP (shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Dazu wurden zum linearisierten Vektor 3.5 Units SAP zugesetzt. Nach 30 min Inkubationsdauer bei 37°C wurde die SAP durch 15 min Erhitzen auf 65°C vollständig inaktiviert. Die Ligation erfolgt dann nach Angaben des Herstellers bei einem Vektor-DNA:Insert-DNA-Stoffmengenverhältnis von 1:1 und 1:5. Die eingesetzten DNA-Mengen lagen zwischen 0.1 µg und 0.5 µg DNA. Der Ligationansatz wurde bei RT für 4 h inkubiert.

### 2.7.2 Herstellung elektrokompeter Zellen

*E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$  und BL21( $\lambda$ DE3)) wurden unter aeroben Bedingungen in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0.6 gezüchtet und dann bei 8000 rpm für 10 min geerntet (Rotor: GSA). Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 40 ml dampfsterilisier-tem deion. H<sub>2</sub>O resuspendiert, in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt und nochmals für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die letzten drei Schritte wurden noch einmal wiederholt. Das Sediment wurde in steriler 10 %-iger Glycerinlösung in Wasser resuspendiert und für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Bakteriense- diment wurde in einem Volumenteil, bezogen auf das Sedimentvolumen, 10 %-iger Glycerinlö- sung resuspendiert, in 1.5 ml Reaktionsgefäßen zu je 40  $\mu$ l portioniert und bei –80 °C eingefro- ren.

### 2.7.3 Transformation von Bakterien

*E. coli*-Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Die Elektroporation wurde durchgeführt wie bei Dower *et al.* (1988) beschrieben. Die Zellen wurden dazu mit 1 – 2  $\mu$ l DNA-Lösung (0.1 – 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. In einem Gene Pulser™ wurden sie durch einen kurzen Spannungsimpuls für die DNA permeabel ge- macht.

Am Gene Pulser™ wurden folgende Einstellungen gewählt:

Kapazität	25.0 $\mu$ F
Spannung	2.5 kV
Widerstand	200.0 $\Omega$

Die Dauer des Impulses lag zwischen 10 und 40 ms.

Es wurden 10  $\mu$ l von der aus dem Transformationsverfahren erhaltenen Zelllösung auf LB-Agar- Platten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert.

### 2.7.4 Plasmidpräparation

Es wurden Plasmid-Präparationen aus 3 ml Kulturansätzen durchgeführt (Minipräp). Die Kulturlösung wurde in zwei sterile 1.5 ml Reaktionsgefäße gegeben, 5 min bei 15000 rpm zentri- fugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment löste man in 300  $\mu$ l Puffer P1 und gab 300  $\mu$ l Puffer P2 hinzu. Zur Vervollständigung der alkalischen Lyse der Zellen wurde die Lösung 5



min bei RT geschwenkt. Zur Protein- und RNA-Fällung wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben, erneut 5 min bei RT geschwenkt und 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. 800 µl des Überstands wurden vorsichtig abgenommen, erneut zentrifugiert und nach Überführung in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß mit 560 µl (0.7 Volumenteile) 100 % Isopropanol versetzt. Das Ausfällen der Nukleinsäuren kann optisch verfolgt werden. Man zentrifugierte die so gefällten Nukleinsäuren für 30 min bei 15000 rpm ab und wusch das Sediment mit 500 µl 70%-iger Ethanollösung. Nach erneuter Zentrifugation wurde die isolierte DNA über Nacht luftgetrocknet und abschließend in 50 µl sterilem deionisiertem Wasser gelöst.

### 2.7.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurde mittels vergleichender Bestimmung der Absorption bei 260, 280 und 320 nm durch ein Ultrospec 2000-Photometer ermittelt. Bei einem Faktor von ca. 1.9 zwischen  $Abs_{260}$  und  $Abs_{280}$  kann die DNA als rein betrachtet werden.

$Abs_{260} = 1.0$  wurde einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt (Sambrock, *et al.*, 1989).

### 2.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von DNA wurden 1 %ige Agarosegele (7.0 cm x 8.2 cm x 0.7 cm) verwendet. Hierbei werden DNA-Fragmente im elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge aufgetrennt. Geräteeinstellungen waren 75 V, 120 mA und 60 min Laufdauer. Nach 30 min Inkubation des Gels in Ethidiumbromid-Lösung wurde das in die DNA-Doppelhelix interkallierende Ethidiumbromid mittels Fluoreszenz über eine Lichtquelle von  $\lambda = 312$  nm detektiert. Längenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit einem Längenstandard von mit *Eco91I* verdauter  $\lambda$ -DNA.

### 2.7.7 DNA-Primer für die Mutagenese

Die für die ortsgerichtete Mutagenese benötigten Primer wurden bei der MWG-Biotech AG bezogen.

Folgende Anforderungen mußten erfüllt werden:

- Primerlänge  $\geq 25$  Basen
- Mutationsstelle in der Mitte der Primer
- terminale Basen G oder C, GC-Gehalt  $\geq 40$  %
- Schmelzpunkt  $T_m \geq 78$  °C:  

$$T_m[^\circ\text{C}] = 81.5 + 0.41 \times (\%GC) - 675/N - \% \text{ ungepaarte Basen}$$

Folgende Primer wurden verwendet:

Y135Ffw	5'-C GAC TTA ACC CCA TTC <u>TTT</u> GGT TTT GAA GAA GAT-3'
Y135Frev	5'-ATC TTC TTC AAA ACC <u>AAA</u> GAA TGG GGT TAA GTC G-3'
Y160Ffw	5'-CCA TTT GGC GAA GAC GTT <u>TTT</u> CCC CGT TAC AAA AAG-3'
Y160Frev	5'-CTT TTT GTA ACG GGG <u>AAA</u> AAC GTC TTC GCC AAA TGG-3'
Y179Ffw	5'-G TTG TGC GAC GAA <u>TTC</u> TTC TAC CTC AAA CAT CGC -3'
Y179Frev	5'-GCG ATG TTT GAG GTA GAA <u>GAA</u> TTC GTC GCA CAA C-3'
Y213Ffw	5'-GC TAC ACC GAC GCT <u>TTT</u> TTA CCA ATT GTC GAG CG-3'
Y213Frev	5'-CG CTC GAC AAT TGG TAA <u>AAA</u> AGC GTC GGT GTA GC-3'
Y240Ffw	5'-CGC GGT CGT <u>TTT</u> GTC GAG TTC AAT CTG GTC TGG-3'
Y240Frev	5'-CCA GAC CAG ATT GAA CTC GAC <u>AAA</u> ACG ACC GCG-3'
Y276Ffw	5'-CTG GTA CGC TGG GAA <u>TTT</u> GAT TAT CAG CCA AAA GAT G-3'
Y276Frev	5'-C ATC TTT TGG CTG ATA ATC <u>AAA</u> TTC CCA GCG TAC CAG -3'
W 36Lfw	5'-GTC GAA GAT AGT <u>TTG</u> CAG CGC GAA GCT G-3'
W 36Lrev	5'-C AGC TTC GCG CTG <u>CAA</u> ACT ATC TTC GAC -3'
W123Lfw	5'-C GAT CCC GTC <u>TTG</u> TGG TTT GGC GGT G -3'
W123Lrev	5'-C ACC GCC AAA CCA <u>CAA</u> GAC GGG ATC G-3'
W124Rfw	5'-GAT CCC GTC TGG <u>AGG</u> TTT GGC GGT GGC-3'
W124Rrev	5'-GCC ACC GCC AAA <u>CCT</u> CCA GAC GGG ATC-3'
W166Lfw	5'-CCC CGT TAC AAA AAG <u>TTG</u> TGC GAC GAA TAC TTC-3'
W166Lrev	5'-GAA GTA TTC GTC GCA <u>CAA</u> CTT TTT GTA ACG GGG-3'
W274Lfw	5'-G CCA CTG GTA CGC <u>TTG</u> GAA TAT GAT TAT CAG C-3'
W274Lrev	5'-G CTG ATA ATC ATA TTC <u>CAA</u> GCG TAC CAG TGG C-3'
W298Lfw	5'-G GTC AGG GAT <u>TTG</u> GTG TAA CTC CCT CAC-3'
W298Lrev	5'-GTG AGG GAG TTA CAC <u>CAA</u> ATC CCT GAC C-3'
H96Lfw	5'-GGC GTT TCA CTG GTA GTG <u>CTT</u> CCG CAT AAC CCG-3'
H96Lrev	5'-CGG GTT ATG CGG <u>AAG</u> CAC TAC CAG TGA AAC GCC-3'
H106Lfw	5'-CCC ACC AGC <u>CTC</u> GCG AAT GTG CGG-3'
H106Lrev	5'-CCG CAC ATT CGC <u>GAG</u> GCT GGT GGG-3'

---

H145Lfw	5'-GCT ATT CAC TGG <u>C</u> TT CGC ACC GCC-3'
H145Lrev	5'-GGC GGT GCG <u>G</u> AA CCA GTG AAT AGC-3'
H175Lfw	5'-C TTC TAC CTC AAA <u>C</u> TT CGC AAC GAA CAG CG-3'
H175Lrev	5'-CG CTG TTC GTT GCG <u>G</u> AA TTT GAG GTA GAA G-3'
G127Vfw	5'-C TGG TGG TTT GGC <u>G</u> TT GGC TTC GAC TTA ACC-3'
G127Vrev	5'-GGT TAA GTC GAA <u>A</u> AC GCC AAA CCA CCA G-3'
P133Afw	5'-GCT TCG ACT TAA <u>C</u> CG CAT TCT ATG GTT TTG-3'
P133Arev	5'-CAA AAC CAT AGA ATG <u>C</u> GG TTA AGT CGA AGC-3'
T132Afw	5'-GCT TCG ACT TAG <u>C</u> CC CAT TCT ATG G-3'
T132Arev	5'-C CAT AGA ATG GGG <u>C</u> TA AGT CGA AGC-3'
C167Sfw	5'-CCC CGT TAC AAA AAG TGG <u>T</u> CC GAC GAA TAC TTC TAC-3'
C167Srev	5'-GTA GAA GTA TTC GTC <u>G</u> GA CCA CTT TTT GTA ACG GGG-3'

Gegenüber der WT-Sequenz veränderte Basen sind unterstrichen. Die *fw*-Abkürzung (forward) kennzeichnet die Sequenz des Sense-Strangs, die *rev*-Abkürzung (reverse) entsprechend die des Antisense-Strangs.

### 2.7.8 Einführung einer Punktmutation in ein Gen

Durch ortsgerichteten Austausch von Basen in der DNA-Sequenz eines Gens können gezielt einzelne Aminosäurereste von rekombinanten Proteinen verändert und so ihre Funktion für Struktur, Substratbindung und Katalyse bestimmt werden.

Für die ortsgerichtete punktuelle Mutation des *E.coli hemF*-Gens wurde das QuikChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Es wurde dabei mittels PCR-Technik und unter Verwendung von Primern der gewünschte Basenaustausch in das Gen eingeführt, und das auf diese Weise mutierte Gen amplifiziert (Abb. 5). Der Wirtsorganismus *E. coli* methyliert die für die PCR benutzte Templat DNA, dagegen wird durch die PCR nicht methylierte DNA synthetisiert. Durch Verdau der PCR-Reaktions-DNA mittels des Restriktionsenzym *DpnI*, das nur an methylierten Palindromen schneidet, wurde die Ausgangs-DNA spezifisch zerstört und so von der gewünschten mutierten DNA entfernt. Elektrokompente *E. coli* (DH5α) Zellen wurden mit dem PCR-Amplifikaten transformiert und die Brüche in den noch offenen zirkulären Amplifikaten durch die zelluläre *E. coli* DNA-Ligase repariert.

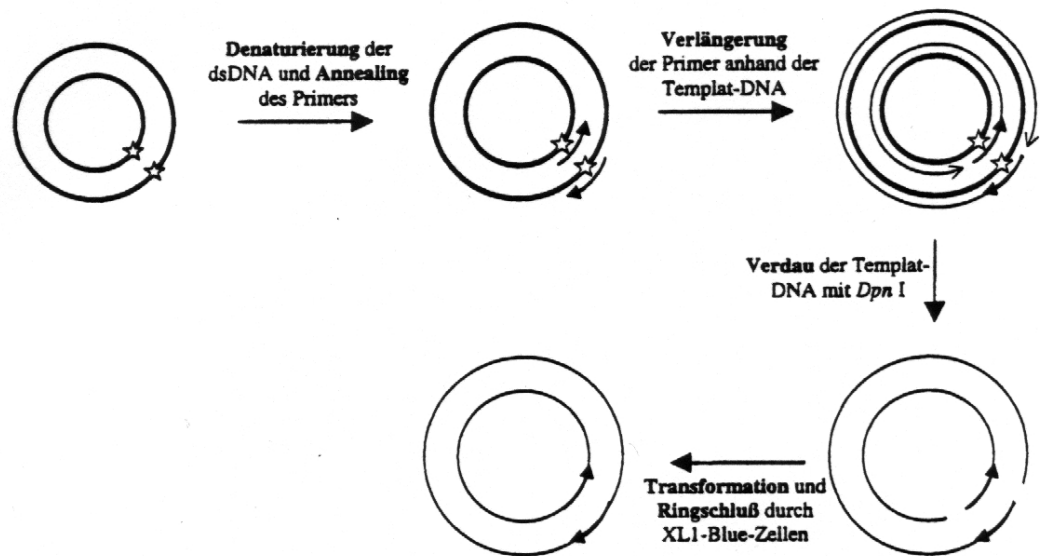


Abb. 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der QuikChange™ Methode (aus der Produktinformation der Firma Stratagene®, 1998).

### 2.7.9 DNA-Sequenzierung

Mutierte sauerstoffabhängige *E. coli* Coprophyrinogen III Oxidase Gene wurden mittels automatisierter DNA-Sequenzierung auf die Präsenz der eingeführten Mutation hin überprüft. Die DNA-Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit durch Dr. Igloi, Institut für Biologie, Universität Freiburg.

## 2.8 Proteinchemische Methoden

### 2.8.1 Rekombinante Darstellung von *E. coli* HemF

#### Rekombinante Proteinsynthese:

Das zur Produktion der rekombinanten sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase aus *E. coli* eingesetzte Plasmid pCAL*hemF* kodiert HemF als N-terminales Fusionsprotein mit dem CBP. Die Expression von *hemF* wird durch einen IPTG induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum

Ampicillin. Exprimiert wurde im proteasedefizienten *E. coli*-Stamm BL21 ( $\lambda$ DE3). Alle durch QuikChange™ erstellten HemF-Mutanten wurden mittels des gleichen Systems produziert.

#### Zellkultivierung (in 1 l-Kolben)

In 1 l-Kolben wurde 500 ml dampfsterilisiertes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 3 ml Übernachtskulturen angeimpft und bis zu einer OD<sub>578</sub> von ca. 0.8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von je 50 µl 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration 0.1 mM IPTG) die Expression der *hemF*-CBP-Genfusion induziert. Die Expression wurde für ca. 16 h bei 30 °C und 200 rpm fortgesetzt. Die Zelldichten erreichten dabei im allgemeinen eine OD<sub>578</sub> von 3.5-7. Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4°C für 10 min (Rotor: GSA) abzentrifugiert.

#### Zellkultivierung (in 10-200 l-Fermentern)

Es wurden drei Serien von Fermentergrößen gefahren, 10 l, 12 l und 200 l. Das entsprechende Volumen an Medium wurde zum Autoklavieren in den Fermenter gegeben. Die Vorkulturen entsprachen 1 % der Fermentergröße. Das weitere Vorgehen entsprach der Zellkultivierung in 1 l-Kolben. Zum Abzentrifugieren der Zellen wurden Durchlaufzentrifugen (Heraeus, 12000 rpm) benutzt. Für die 12 l-Fermenter wurde LB-Medium benutzt, für die 10 l- und den 200 l-Fermenter wurde dagegen MMA-Minimalmedium benutzt.

#### Zellaufschluß

Je 5 g Zellen wurden in 10 ml Zellaufschlußpuffer resuspendiert und durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 0.5 s Puls und 0.5 s Pause, 15 min, 70 % Amplitude, Mikrospritze MS 73) aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verifiziert. Die erhaltene Suspension zentrifugierte man für 60 min bei 50000 rpm und 4 °C (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 60).

#### Affinitätschromatographie an Calmodulin-haltiger Matrix

0.5 ml Calmodulin Affinitätschromatographiematerial wurde in einem 50 ml Polypropylen-Reaktionsgefäß zweimal mit 10 ml sterilem deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Das Fusionsprotein wurde durch Zugabe der cytosolischen Fraktion des Zellaufschluß zum äquilibrierten Affinitätsmaterial über Nacht bei 4 °C unter Schütteln bei 100 rpm gebunden. Das Säulenmaterial wurde danach in eine 1 ml Säule überführt und mit 10 ml Bindungspuffer mit einer Flussrate von 1

ml/min gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit Elutionspuffer unter Sammeln von 1 ml Fraktionen eluiert und die das Fusionsprotein beinhaltende Fraktionen durch SDS-PAGE verifiziert.

#### Affinitätschromatographie an Calmodulin (mit Manganionen und W7)

HemF wurde genauso gereinigt wie oben beschrieben, jedoch war die Pufferzusammensetzung eine andere. Beim Bindungspuffer wurde 4 mM  $\text{MnCl}_2$  statt Ca- und Mg-Ionen eingesetzt. Im Elutionspuffer war 10 mM W7, ein Calmodulin-Inhibitor, der zur Entfaltung des Calmodulins statt des EGTA führt, gelöst.

#### Protease-Verdau des Fusionsproteins

Zur Spaltung des Fusionsproteins in CBP und HemF wurde die Proteinlösung (1 mg/ml) zuerst 2 h und dann über Nacht (ca. 14 h) jeweils gegen 250 ml Thrombinspaltungspuffer bei 4°C dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde mit 40 U Thrombin Protease (Pharmacia) je mg Protein versetzt und für 16 h bei 30 °C inkubiert. Der Verlauf des Verdaus wurde per SDS-PAGE verfolgt. Nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins verblieben N-terminal drei zusätzliche Aminosäurereste an HemF.

#### Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen von 10 ml wurden in Millipore-Konzentratoren (Ausschlußvolumen 10000 Da) mittels Zentrifugation bei 3000 g nach Anweisungen des Herstellers konzentriert.

## **2.8.2 Chromatographische Reinigung und Analyse von rekombinantem HemF**

#### Analytische Gelpermeationschromatographie mittels Superdex 200

Mittels GPC können Moleküle nach ihrer nativen molekularen Masse und Form getrennt werden. Dabei erfolgt die Elution für große Moleküle schneller als für kleine. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Fähigkeit der Moleküle, in die Säulenmatrix zu diffundieren. Diese besteht aus porösen Kügelchen aus hochvernetztem Agarosegel mit kovalent gebundenem Dextran. Für die in dieser Arbeit durchgeführte analytische GPC zur Bestimmung der nativen Molekularmasse wurde eine Superdex 200 HR 10/30-Säule von Pharmacia ( $V_t = 24$  ml) verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch bei RT mit GPC-Puffer und mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. Es wurden 50 µl einer 1 mg/ml HemF-Lösung auf die Chromatographiesäule aufgetragen.

Durch separate Eichläufe mit Eichproteinen bekannter nativer molekularer Masse konnte die native molekulare Masse des zu untersuchenden Proteins bestimmt werden. Die abgeleitete relative molekulare Masse kann allerdings Abweichungen von der tatsächlichen Masse aufweisen, da bei der Trennung mittels GPC auch die Form der Moleküle eine wichtige Rolle spielt.

#### Kationenaustauscherchromatographie mittels MonoS

Es wurde eine MonoS 5/5 (Pharmacia) mit einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Die Chromatographiesäule wurde mit 5 Säulenvolumen MonoS-Bindungspuffer äquilibriert, mit 5 ml sterilfiltrierter Proteinlösung (maximal 10 mg) beladen und mit MonoS-Elutionspuffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Es wurden 0.5-1 ml Fraktionen gesammelt.

#### Präparative Gelpermeationschromatographie mittels Superdex 200

Für die Abtrennung letzter Verunreinigungen verwendete man eine mit Superdex 200 HR 10/30-Säule ( $V_t = 24$  ml) benutzt. Diese wurde über Nacht mit 2 Säulenvolumen GPC-Puffer äquilibriert, mit 0.3 ml konzentriertem und sterilfiltrierten Fraktionen des Kationenaustauschers beladen und mit GPC-Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Es wurden 0.5-2 ml Fraktionen gesammelt.

### **2.8.3 Anaerobe Darstellung von rekombinantem HemF**

#### Zellkultivierung mit einem Übergang zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen

Ein 100 ml fassender Kulturkolben mit LB-Medium wurde mit *E. coli* pCal *hemF* -Zellen unter aeroben Bedingungen angeimpft und nach Verschluss des Deckels inkubiert. Diese Vorkultur verbrauchte allen Sauerstoff über Nacht während des Zellwachstums. Mit 50 ml dieser Vorkultur wurde ein 1 l-Kolben gefüllt mit 500 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin angeimpft, luftdicht verschlossen und bis zu einer  $OD_{578}$  von ca. 0.2 bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von je 50 µl 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration 0.1 mM IPTG) die Expression der *hemF*-CBP-Genfusion induziert. Auch hier anaerobisierte die Zellkultur erst während des Zellwachstums. Die Expression wurde für ca. 16 h bei 30 °C und 100 rpm fortgesetzt. Die Zelldichten erreichten dabei eine  $OD_{578}$  von 2. Die weitere Behandlung der Zellen und die affinitätschromatographische Reinigung des HemF erfolgten unter anaeroben Bedingungen genau so wie es unter **2.8.1** beschrieben wurde. Allerdings erfolgte der Zellaufschluss mittels der

French-Press unter strikt anaeroben Bedingungen bei einem Druck von 40,000 PSI unter Schutzgasatmosphäre.

#### Strikt anaerobe Darstellung von HemF

Eine 100 ml-Vorkultur mit LB-Medium wurde mit *E. coli* pCal *hemF* -Zellen unter aeroben Bedingungen angeimpft. Diese Vorkultur anaerobisierte über Nacht während des Zellwachstums. In einem anaeroben Zelt wurde unter Schutzgasatmosphäre mit 20 ml dieser Vorkultur eine bereits strikt anaerobe 100 ml-LB-Vorkultur angeimpft, die dann über Nacht unter Schütteln bei 100 rpm inkubierte. Eine bereits strikt anaerobisierte 500 ml-LB-Hauptkultur wurde mit 50 ml dieser strikt anaeroben Vorkultur angeimpft. Das weitere Vorgehen bezüglich Proteinproduktion und Proteinreinigung entsprach der oben besprochenen Prozedur.

#### **2.8.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die exakte Konzentration einer homogenen Proteinlösung lässt sich über deren Absorption bei 280 nm bestimmen. Voraussetzung ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz des gelösten Proteins. Aus der Anzahl der bei 280 nm absorbierenden Aminosäurereste Tryptophan, Tyrosin und Cystein lässt sich der theoretische molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  nach Gleichung (1) berechnen (Gill & van Hippel, 1989):

$$\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Cys}} \cdot \epsilon_{\text{Cys}} \quad \text{Gleichung (1)}$$

$n_x$  : Anzahl der jeweiligen Aminosäuren im Protein

$\epsilon_x$  : Extinktionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bei 280 nm

( $\epsilon_{\text{Trp}} = 5,690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{Tyr}} = 1,280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{Cys}} = 60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

Bei einer Anzahl von 8 Tryptophanen, 13 Tyrosinen und 4 Cysteinen errechnet sich der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  für das rekombinante HemF aus *E. coli* zu  $62,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Über das Lambert-Beer'sche Gesetz kann die Konzentration der Proteinlösung nach Gleichung 2 berechnet werden.



$$c[\text{mg} / \text{ml}] = \frac{M_r[\text{g} / \text{Mol}] \cdot A_{280}}{\varepsilon[\text{Mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] d[\text{cm}]} \quad \text{Gleichung (2)}$$

$d$  := Schichtdicke der Küvette, [cm ], (hier 1 cm)  
 $M_r$  := relative molekulare Masse  
 $\varepsilon$  := Absorptionskoeffizient, [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]  
 $A_{280}$  := Absorption bei 280 nm

Da das berechnete Molekulargewicht von HemF 34,333 Da pro Untereinheit beträgt, ergab sich die Faustformel, daß eine Absorption von 1.0 in Standardküvetten einem Proteingehalt von ca. 0.55 mg/ml entsprach.

### 2.8.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der molaren Masse ihrer Untereinheiten aufgetrennt (Lämmli, 1970). Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel bei pH = 8.8 fokussiert und dann bei pH 6.8 im Trenngel aufgetrennt, wodurch sich Bandenschärfe und Trennleistung deutlich erhöhten (Righetti *et al.*, 1990). Es wurden 12 %-ige Gele (Bio Rad Mini Protean 2 System, 8.4 cm x 7.3 cm x 0.5 cm) verwendet. Die Proben enthielten 10 µl Probenmaterial und 10 µl Probenpuffer. Diese Lösungen wurden zur vollständigen Denaturierung 10 min gekocht und dann 30 sec bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 45 mA pro Minigel durchgeführt (Dauer = ca. 30 min). Die Färbelösung wurde im Mikrowellenofen zum Kochen erhitzt und die Gele darin für ca. 5 min geschwenkt. Anschließend wurden sie bis zur völligen Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix in Entfärberlösung geschwenkt, fotografiert und zur Konservierung zwischen zwei Cellophanfolien an der Luft getrocknet.

### 2.8.6 Elektrotransfer und N-terminale Proteinsequenzierung des HemF-Spaltproduktes

Zunächst wurde das HemF-Fragment aus einem SDS-PAGE Gel mittels Western Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran zusammen mit dem SDS-PAGE Gel, zwischen vier mit Blottingpuffer gesättigten Lagen Chromatographiepapier in eine Blottingapparatur gebracht. Dabei befand sich die Membran auf der Seite der Anode und das SDS Gel

auf der Seite der Kathode. Die Transferzeit betrug 1.5 h bei einer Stromstärke von 55 mA pro Minigel ( $0.8 \text{ mA/cm}^2$ ). Für die anschließende Ponceau-Färbung wurde die Membran zweimal für 10 min mit deionisiertem Wasser gewaschen und dann in die Färbelösung gegeben. Zum Stoppen der Färbung wurde die Membran mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Das Fragment wurde dann auf einem Applied Biosystems 477A Sequencer verbunden mit einem 120A Analyser von Dr. E. Schiltz (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Schulz, Institut f. Organ. Chemie u. Biochemie, Universität Freiburg) N-terminal ansequenziert.

### 2.8.7 Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die molekulare Masse des monomeren *E. coli* HemF wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt. Die ESI-MS wurde von C. Warth (Analytikzentrum Organische Chemie, Universität Freiburg) an einem Finnigan Mat TSQ 7000 Gerät durchgeführt. Es wurde eine 1 mg/ml HemF-Lösung in 30 % Ethanol eingesetzt.

### 2.8.8 Glycerindichtegradientenzentrifugation

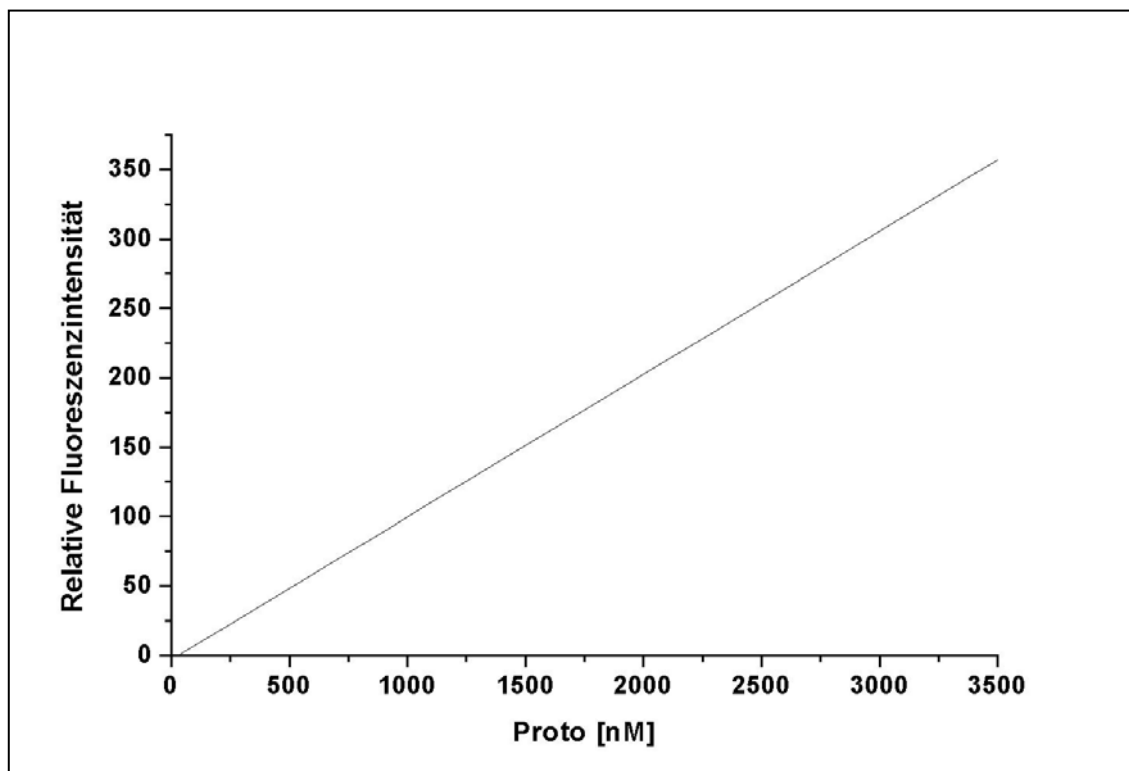
50  $\mu\text{l}$  HemF (ohne CBP) wurden durch 2.5 ml eines kontinuierlichen 10-35 % (w/v) Glyceringradienten (in GPC-Puffer) sedimentiert. Der Gradient wurde bei  $100,000 \times g$  für 18 h bei  $4^\circ\text{C}$  in einem Kontron TST60.4 Rotor zentrifugiert. In einem Parallelgradienten wurden je 50  $\mu\text{g}$  Eichprotein mit bekannter  $M_r$  (Ovalbumin 43,000; Holo-Transferrin 81,000) unter identischen Bedingungen sedimentiert und per SDS-PAGE analysiert.

### 2.8.9 Bestimmung der Aktivität von HemF

#### Prinzip des Enzymtest:

HemF katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen III (Coprogen) zu Protoporphyrinogen IX (Protogen). Durch Zugabe der Reaktionsstopplösung Wasserstoffperoxid werden Edukt und Produkt der Reaktion zu Coproporphyrin III (Copro) und Protoporphyrin IX (Proto) oxydiert. Diese Oxydationsprodukte weisen unterschiedliche Fluoreszenzspektren auf, wodurch eine fluorimetrische Detektion sowie eine quantitative Analyse der Reaktion möglich ist. Die Anregungswellenlänge beträgt für Copro und Proto 409 nm, während die Emission von

Copro bei 618 nm und die für Proto bei 633 nm erfolgt. Über die Emissionsintensität des Protos kann die Produktkonzentration der Reaktion ermittelt werden (Abb. 6).



**Abb. 6:** Fluoreszenz von Proto bei verschiedenen Konzentrationen (Eichgerade). Geräteeinstellungen: wie unten beschrieben, die Emission wurde bei 633 nm gemessen. Aus der Kalibrierungskurve ergaben sich 0.103 Fluoreszenz Intensitätseinheiten pro 1 nM Proto.

Die Fluorimetereinstellung wurde wie folgt gewählt:

Anregungswellenlänge:	409 nm
Detektionsbereich der Emission:	570-680 nm
Scangeschwindigkeit	200 nm/min
Spaltöffnung der Anregungswellenlänge	5 nm
Spaltöffnung der Emissionswellenlänge	5 nm

#### Darstellung des Substrats Coproporphyrinogen III

Das Substrat Coproporphyrinogen III wurde durch Reduktion von Coproporphyrin III (Sigma) erhalten. Als Versuchsanleitung diente eine modifizierte Vorschrift von Grandchamp und Nordmann (1982): 2.9 mg (4  $\mu$ mol) Copro wurden in 3 ml 50 mM KOH unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 2 g 3 %igem Na-Amalgam reduziert. Es wurde so lange bei RT unter Rühren und Lichtausschluß inkubiert, bis die Lösung entfärbt war. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Glaswolle filtriert, mit Kinetikpuffer auf 10 ml aufgefüllt, 69 mg DTT zugegeben und mit 20 %iger  $H_3PO_4$  ein pH von 7-8 eingestellt.

### Bedingungen des Enzymtests

Für den Standardenzymtest (Kruse *et al.*, 1995) wurden in einem 500 µl Ansatz 0,56 µg (0,33 µM) rekombinantes, homogenes HemF Enzym und 20 µM Coprogen in Kinetikpuffer für 30 min bei 37 °C, 900 rpm im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung (30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) beendet. Um eine komplette Oxidation des Edukts und Produkts zu gewährleisten wurde für weitere 30 min bei 37 °C und 900 rpm inkubiert.

### Anaerober Enzymtest

Die Ansatzgröße und die Konzentrationen waren die selben wie beim aeroben Standardenzymtest beschrieben. Sämtliche Lösungen wurden anaerobisiert und in ein anaerobes Zelt eingeschleust. Unter Schutzgasatmosphäre wurden die Enzymtests zusammengemischt. Die Reaktion erfolgte bei einer Temperatur von 18°C. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurden die Ansätze aus dem anaeroben Zelt ausgeschleust.

### Enzymkinetiken

Die kinetischen Parameter der sauerstoffabhängigen *E. coli* Coproporphyrinogen III Oxidase bzw. deren Mutanten, wurde mittels Michaelis-Menten-Kinetik und der Linearisierung nach Lineweaver-Burk bestimmt. Dazu wurde nach dem Standardtest der zeitliche Verlauf der Reaktion bei vier unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen. Es wurden Substratkonzentrationen von 20 µM, 8 µM, 4 µM und 0,8 µM benutzt. Die Enzymreaktion wurde in 10 ml Polypropylen-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde ohne Substrat im Wasserbadsschüttler für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe der entsprechenden Menge Coprogen gestartet. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten wurden aus einem 4,5 ml Reaktionsansatz zu definierten Zeiten (0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min, 15 min, 20 min und 30 min) jeweils 500 µl Reaktionslösung entnommen und mit 50 µl Stop-Lösung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt, kurz geschüttelt und bei RT stehengelassen. Nach Beendigung einer Versuchsreihe wurden die oxidierten Proben fluorimetrisch vermessen.

## **2.8.10 Untersuchung der Coproporphyrinogen III-Oxidase-Aktivität mittels HPLC**

Zusätzlich zur fluorimetrischen Detektion des während des Aktivitätstests gebildeten Proto wurde auch eine Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC durchgeführt.

Die HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenflüssigchromatographie (LC), mit deren Hilfe Substanzgemische innerhalb von we-

nigen Minuten getrennt und analysiert werden können. Charakteristisch für die HPLC im Vergleich zur klassischen LC sind kleinere Säulen aus druckfesten Materialien (Stahl, stabiles Glas, Polymere), kleinere Teilchengrößen der stationären Phasen mit damit verbundener großer Oberfläche und das Arbeiten unter hohen Drucken (bis zu 80 MPa). Ein weiterer Vorteil der HPLC ist der Bedarf an nur sehr geringen Probenmengen (pg- bis µg-Bereich).

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Tetrapyrrole, die bei der enzymatischen Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX und der anschließenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation entstehen, mittels Reversed-Phase-HPLC getrennt. Bei der dabei verwendeten Säule handelte es sich um eine ODS Hypersil C18 (Porengröße: 120 Å, Korngröße: 5 µm, 4.6 x 250 mm). Als Porphyrin-Standards wurden Coproporphyrin III und Protoporphyrin IX, gelöst in 10 %iger HCl, eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 17 % (v/v) 1 M Ammoniumacetat (pH 5.2) in Methanol bei einer Flußrate von 1 ml/min verwendet (Soriano *et al.*, 2000). Die Säule wurde vor Probenauftrag mit ca. 20 ml Laufpuffer äquilibriert, bis eine konstante Basislinie zu beobachten war. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:

200 µl der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidierten Enzymtestlösung wurden mit 600 µl 10 %iger HCl versetzt und anschließend zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 10 min, 15000 rpm), um ausgefallenes Protein abzutrennen. Der Überstand wurde in ein geeignetes Probengefäß überführt und je 20 µl der Probe wurden automatisch auf die Säule aufgetragen. Die Detektion erfolgte sowohl durch Absorptionsmessung im UV/Vis-Bereich, wobei alle 800 ms ein Spektrum von 190 – 650 nm aufgenommen wurde, als auch durch einen Fluoreszenzdetektor (Anregungswellenlänge: 409 nm, Emissionswellenlänge: 630 nm, Spaltbreite: 18 nm).

### 2.8.11 Addition von Chelatisierungsreagenzien und Metallen

Die Untersuchung der HemF-Aktivität erfolgte unter Verwendung des Standardenzymtests (s. 2.8.9). Etwa eine Stunde vor dem Start der Reaktion mit Coprogen wurde der Ansatz mit dem jeweiligen Reagenz versetzt und bei 37°C inkubiert.

### 2.8.12 Addition von Radikalfängern zum anaeroben Aktivitätstest

Die Untersuchung der HemF-Aktivität erfolgte unter Verwendung des anaeroben Standardenzymtests (s. 2.8.9). Etwa eine Stunde vor dem Start der Reaktion mit Coprogen wurde der Ansatz unter Schutzgasatmosphäre mit 10 mM des jeweiligen Radikalfängers (bei DMSO 0.1 %

v/v) versetzt und bei 18°C inkubiert. Die Lösung mit dem Radikalfänger wurde erst im anaeroben Zelt hergestellt, wobei als Puffer der Kinetikpuffer verwendet wurde.

### **2.8.13 Entfaltung von HemF mittels Harnstoff und Rückfaltung in An- und Abwesenheit von Metallionen**

5 µl HemF-Lösung (Endkonzentration 0.33 µM) wurden mit 45 µl einer 8 M Harnstofflösung versetzt (Endkonzentration 7.2 M). Diese Lösung wurde mit 250 µl Kinetikpuffer (mit oder ohne Metallionen) verdünnt. Danach erfolgte eine Dialyse gegen den Kinetikpuffer (mit oder ohne Metallionen). Für den Aktivitätstest wurden Kinetikpuffer und die restlichen Reagenzien in solchen Mengen zugegeben, daß die gleichen Volumina und damit auch Konzentrationen vorlagen wie für den Standardenzymtest beschrieben (2.8.9).

### **2.8.14 Spektroskopischer Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der von HemF katalysierten Reaktion**

#### Nachweis mit Thiamin

Bei diesem Nachweis (Li *et al.*, 2000) wird Thiamin durch Wasserstoffperoxid zu Thiochrom umgesetzt (katalysiert durch Hemin). Das Thiochrom kann fluorimetrisch detektiert werden (Anregungswellenlänge 373 nm, Emissionswellenlänge 440 nm). Ein 500 µl Ansatz mit 0,56 µg (0.33 µM) rekombinantem gereinigtem HemF, 0.1 % Triton, 20 µM Coprogen und 10 µM Thiamin in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 8.5) wurde für 10 min bei 37 °C, 900 rpm im Dunkeln inkubiert. Dann wurde der Ansatz mit 10 µM Hemin versetzt. Nach 20 min wurde der Ansatz fluorimetrisch bestimmt (Anregungswellenlänge 373 nm, Emissionsspektrum von 400 nm bis 520 nm, Spaltbreiten 5 nm).

#### Nachweis mit 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)

Der Nachweis (Batosz *et al.*, 1998) basiert auf der Umsetzung von ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) zum grünen ABTS<sup>•+</sup>-Radikal (Absorption bei 414 nm). Ein 500 µl Ansatz mit 0,56 µg (0.33 µM) rekombinantem gereinigtem HemF, 0.1 % Triton, 20 µM Coprogen und 150 µM ABTS in 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7.0) wurde für 30 min bei 37 °C, 900 rpm im Dunkeln inkubiert. Die Bildung des ABTS<sup>•+</sup>-Radikals wurde dann photometrisch verfolgt.

## 2.8.15 Proteinmodifikationen

### 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid

Die Modifikation von Proteinen wurde mit dem Tryptophan spezifischen Modifikationsreagenz, 2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid (HNB-Br) in Dioxan (0.4 mg/ml), durchgeführt (Horwitz *et al.*, 1974). Dazu wurde das Protein zunächst entfaltet. Dies geschah durch Zugabe von 30 µl 8 M Harnstofflösung zu 15 µl Proteinlösung (1.12 mg Protein / ml Thrombinspaltungspuffer). Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Modifikationsreagenz zugegeben und der Ansatz wieder für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm inkubiert. Zur Rückfaltung des Proteins wurde der Reaktionsansatz gegen 200 ml Kinetikpuffer dialysiert. Das auf diese Weise modifizierte Protein wurde enzymkinetisch charakterisiert. Als Referenz, wurde die gleiche Menge Protein ohne Zugabe des Modifikationsreagenzes unter den gleichen Bedingungen denaturiert, renaturiert und enzymkinetisch charakterisiert.

### N-Chlorsuccinimid

3.4 mM HemF in 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer (pH 7.6) wurde mit 0.16 mM N-Chlorsuccinimid (spezifisch für die Aminosäurereste Histidin, Tryptophan, Lysin und Methionin) versetzt (Gesamtvolumen 500 µl) und bei 37°C inkubiert (Lischwe *et al.*, 1977). Nach 30 min wurde die Reaktion mit 2,4 mM N-Acetyl-L-methionin gestoppt. Danach wurde das so modifizierte HemF einer kinetischen Untersuchung unterzogen (s. 2.8.9). Als Referenz diente die gleiche Menge Protein ohne Zugabe des Modifikationsreagenzes, das unter den selben Bedingungen weiter behandelt wurde.

### Diethylpyrocarbonat

Diethylcarbonat (spezifisch für Histidin, Tyrosin und Lysin) wurde in abs. Ethanol gelöst (Dumas *et al.*, 1990). 3.4 mM HemF in Kinetikpuffer wurden mit Diethylcarbonat (12 mM) versetzt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Gesamtvolumen 500 µl). Die Reaktion wurde mit 20 mM Imidazol gestoppt. Danach wurde das so modifizierte HemF einer kinetischen Untersuchung unterzogen (s. 2.8.9). Als Referenz diente die gleiche Menge Protein ohne Zugabe des Modifikationsreagenzes, das unter den selben Bedingungen weiter behandelt wurde.

### Iodoacetamid, 2,3-Butandion, Pyridoxal-5'-phosphat und Tetranitromethan

3.4 mM HemF in 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer (pH 7.6) wurde mit dem jeweiligen Modifikationsreagenz versetzt (Gesamtvolumen 500 µl) und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde das so modifizierte HemF einer kinetischen Untersuchung unterzogen (s. 2.8.9). Als Referenz diente die gleiche Menge Protein ohne Zugabe des Modifikationsreagenzes, das unter den selben Bedingungen weiter behandelt wurde.

renz diente die gleiche Menge Protein ohne Zugabe des Modifikationsreagenzes, das unter den selben Bedingungen weiter behandelt wurde. Folgend die Konzentrationen der Modifikationsreagenzien:

Iodoacetamid: (Kleanthous <i>et al.</i> , 1990)	1 M (spezifisch für Histidin, Methionin, Cystein und Lysin)
2,3-Butandion: (Epperly <i>et al.</i> , 1989)	10 mM (spezifisch für Arginin)
Pyridoxal-5'-phosphat: (Miller <i>et al.</i> , 1989)	5 mM (spezifisch für Lysin)
Tetranitromethan: (Sokolovsky <i>et al.</i> , 1966)	84 mM (spezifisch für Tryptophan, Tyrosin und Cystein)

### 2.8.16 Kristallisation von HemF

Für die Kristallisationsexperimente wurde affinitätschromatographisch gereinigtes HemF (ohne CBP) verwendet, wobei während der Reinigung statt Triton X-100 mit Octadecylethoxytetraethylen ersetzt wurde. Zur Kristallisation der Proteine wurde die Hängetropfen-Methode (Mc Pherson, 1990) (Abb. 7) verwendet. Hierbei wird dem Protein im Hängetropfen über die Gasphase langsam Wasser entzogen, so daß es zu einer Übersättigung der Proteinlösung kommt. Durch Verwendung geeigneter Fällungsmittel wie anorganischen Salzen, organischen Lösungsmitteln oder Polyethylenglykolen kann es im Idealfall zur Kristallisation des Proteins kommen.

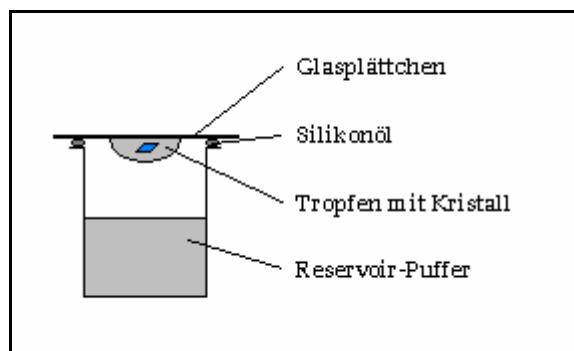


Abb. 7: Schematische Darstellung der Hängetropfen-Methode.

Das Reservoir wird mit 500 µl Fällungsmittel enthaltender Puffer-Lösung befüllt. 5 µl dieser Pufferlösung werden dann mit 5 µl einer ca. 10 mg/ml Protein enthaltenden, gepufferten Proteinlösung auf einem Glasplättchen zu dem Tropfen vereinigt und über das Reservoir gehängt. Silikonöl an der Kontaktstelle Reservoir-Glasplättchen sorgt für Luftabschluss nach außen. Durch die Vereinigung von jeweils 5 µl an Protein-Lösung und Reservoir-Lösung im Tropfen ist die Konzentration des Fällungsmittels zu Beginn des Kristallisationsexperiments halbiert wor-



den. Das führt zu einem Konzentrationsunterschied bezogen auf die Fällungsmittel zwischen Tropfen und Reservoirlösung. Dadurch kommt es zum Wasserentzug aus dem Tropfen über die Gasphase. Es wurden die Crystall Screens I und II eingesetzt, diese Screen-Kits sind Produkte der Firma Hampton Research (Laguna Hills, U.S.A.). Für die Kristallisationsansätze wurde zu je 250 µl Proteinlösung jeweils 25 µl einer 20 µM Coprogen-Lösung zugesetzt.

## **2.9 Biophysikalische Methoden**

### **2.9.1 Metallbestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie**

#### Prinzip

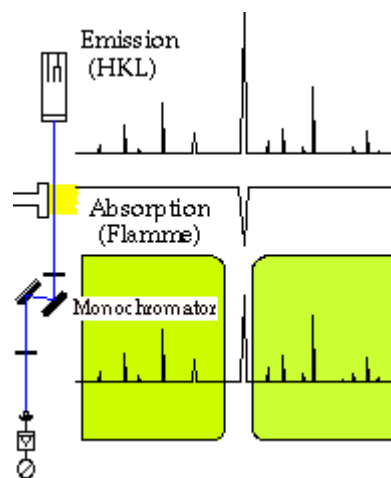
Freie Atome sind in der Lage, ganz definierte Energiebeträge aufzunehmen und nach einer sehr kurzen Anregungszeit (ca.  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  Sekunden) wieder abzugeben. Die Energieabgabe erfolgt in Form von Strahlung. Elektronen der äußeren Schale werden durch die zugeführte Wärmeenergie in einen energetisch höheren Zustand gebracht, der für die Atomart durch das Termschema festgelegt ist. Die Differenz zwischen dem angeregten Energiezustand und dem Grundzustand eines Elektrons der äußeren Schale entspricht dem aufgenommenen bzw. abgegebenen Energiebetrag. Dieser Energiebetrag kann mit einer, für das Atom charakteristischen Spektrallinie in Zusammenhang gebracht werden. Bei Atomen lassen sich verschiedene Arten der Energieaufnahme bzw. Energieabgabe unterscheiden, die mit Strahlung verbunden sind.

#### Absorptionsspektren

Liegen genügend Atome im Grundzustand vor (was bei Einsatz einer Acetylen/Luft Flamme oder eines Graphitrohrofens der Fall ist), die sich aber durch die thermische Energie nicht anregen lassen, kann die Anregung durch eingestrahktes Licht erfolgen. Hierbei sind die Atome im Grundzustand in der Lage, Lichtenergie genau definierter Frequenzen zu absorbieren und dabei in den angeregten Zustand überzugehen. Als Lichtquelle verwendet man Linienstrahler - Hohlkathodenlampen, die das Element enthalten, das bestimmt werden soll.

### Aufbau und Funktionsweise eines Atomabsorptionsspektrometers

Der Aufbau eines AAS-Gerätes ist einfach. Er besteht aus einer Strahlungsquelle, der Atomisierungseinrichtung, dem Monochromator und dem Detektor (Abb. 8). Eine Lampe sendet das Spektrum des zu bestimmenden Elements aus. In der Atomisierungseinheit (Flamme) wird ein der Konzentration des betreffenden Elements entsprechender Anteil der Strahlung auf den Resonanzlinien absorbiert. Nach der spektralen Zerlegung im Monochromator wird durch den Austrittsspalt eine Resonanzlinie ausgesondert und alle anderen Linien ausgeblendet. Der Detektor erfaßt daher nur die eine Resonanzlinie, deren Schwächung durch die Probe ein Maß für die Konzentration des Elements in der Probe ist.



**Abb. 8:** Grundlegender Aufbau und Funktionsweise eines AAS. Links ist schematisch der Aufbau eines AAS wiedergegeben, inklusive des blau gefärbten Strahlenganges (der Strahl endet unten am Detektor). Rechts ist die Veränderung des durch die HKL emittierten Spektrums durch Absorption der eingebrachten Probe dargestellt. HKL, Hohlkathodenlampe.

Allerdings stört bei dieser Anordnung die Flammenemission, die zusätzlich zum Lampenlicht gemessen wird. Um diese beiden Signale voneinander unterscheiden zu können, wird das Lampenlicht getaktet (z.B. mit 50 Hz). Der Detektor wird so geschaltet, daß er lediglich das getaktete Signal der Lampe, nicht aber das ungetaktete der Flammenemission erfaßt. Noch genauer funktioniert dabei die Zweistrahltechnik: Der Strahl wird von einem Sektorspiegel abwechselnd durch die Flamme und um sie herum geleitet. Nach der Strahlenvereinigung mithilfe eines halbdurchlässigen Spiegels wird der Unterschied der beiden Strahlen als Wechselspannung gemessen, die der Absorption entspricht.

### Strahlungsquellen

Aus einem kontinuierlichen Spektrum absorbieren die Atome des zu bestimmenden Elements nur sehr enge Frequenz-Bereiche (Linien). Die Intensität des Lichtes in diesen schmalen

Bereichen ist sehr gering, ebenso die Gesamtschwächung des Lichtes. Aus diesem Grund verwendet man Lampen, die das Spektrum des zu bestimmenden Elements ausstrahlen. Dies sind z.B. Hohlkathodenlampen, bei denen eine hohe Spannung zwischen der mit dem zu bestimmenden Element belegten Kathode und der Anode angelegt wird. Durch die Spannung werden geladene Gasteilchen beschleunigt; diese schlagen aus der Kathode Atome heraus, die als Gas im Kathodenraum durch die elektrische Spannung zur Emission angeregt werden.

Die Linien, die ausgesendet werden, sind jedoch wegen des Doppler-Effektes der sich schnell bewegenden Atome wesentlich breiter als die Absorptionslinien. Durch Selbstabsorption der Atome im Grundzustand, noch in der Lampe selbst, wird aus den breiten Linien ein Teil der emittierten Strahlung abgeschwächt. Neben den elementspezifischen Lampen sind auch Mehr-elementlampen in Gebrauch, bei denen allerdings nur Elemente, die sich in ihren Emissionslinien nicht überschneiden, kombiniert werden können. Elektrodenlose Entladungslampen arbeiten mit einem Hochfrequenzfeld, in dem das in einer Quarzkugel eingeschmolzene Element zur Emission angeregt wird.

#### Atomisierungseinrichtungen

Um die Atome gasförmig in den Strahlengang der Lampe zu bekommen, gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Zerstäuben der Probe in einer Flamme (Flammen-Technik)
- Verdampfen der Probe in einem Graphitrohrföfen (Graphitrohr-Technik)
- Herstellung des Hydrids des Elements und Austreiben mit Gasstrom in eine Quarzglas-küvette (Hydrid-Technik)
- Für Quecksilber: Reduktion zum elementaren Quecksilber, Austreiben in eine Küvette (Kaltdampf-Technik)

Die robusteste und einfachste Möglichkeit ist die Flammen-Technik.

#### Flammen-Technik

Die Flammen-AAS nutzt zur Atomisierung der Probe eine Luft-Acetylen-Flamme, in die die Probe eingebracht wird. Für bestimmte Elemente, die bei den Temperaturen von bis zu 2550 K nicht vollständig atomisiert werden (Bildung schwer verdampfbarer Oxide), kann auch eine Lachgas-Acetylen-Flamme eingesetzt werden, die allerdings einen speziellen Brenner benötigt.

Für die Messung besonders wichtig ist die gleichmäßige und reproduzierbare Ansaugung und Durchmischung der Probe mit dem Brenngas. Diesem Zweck dient eine 'Mischkammer'. Die Probe wird mithilfe des Brenngasstromes angesaugt und in einer Mischkammer mit Prallkugel

oder an Prallflächen zerstäubt und gründlich durchmischt, bevor das Gemisch durch den schmalen Schlitz des Brenners austritt. Nach Zündung brennt die Flamme laminar (nicht turbulent). Zur Optimierung der Zerstäubung kann die Oxidanszufuhr geregelt werden; eine zweite Oxidanszufuhr läßt das Brenngasgemisch und die Ansauggeschwindigkeit unabhängig regeln.

### Monochromator

Zur Messung muß man aus den möglichen Linien die geeignetste herausgreifen. Außerdem sind die Emissionslinien - wie bereits gesagt - wesentlich breiter als die Absorptionslinien. Es ist daher erforderlich, aus dem gesamten Spektrum nur einen sehr schmalen Bereich herauszugreifen. Dazu dient der Monochromator. Prinzipiell besteht er aus Eintrittsspalt, dem dispergierenden Medium (Prisma oder Gitter) und dem Austrittsspalt. Je kleiner die Spalten sind, desto besser ist einerseits die Auflösung, desto geringer ist aber auch das zu messende Signal. Daher kommt es auf die Dispersion des Gitter an. Je kleiner dessen reziproke Lineardispersion ist, also der Wellenlängenbereich pro geometrische Spaltbreite, desto besser ist das Auflösungsvermögen. Ein Maß dafür ist die spektrale Spaltbreite, die die Breite des Wellenlängenintervalls (in nm) angibt, das den Monochromator passiert.

Heute werden fast ausschließlich Gitter (geritzte oder holographische Gitter) eingesetzt, die über den gesamten Wellenlängenbereich die gleiche Lineardispersion aufweisen.

### Detektor

Als Detektoren werden meist Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher) eingesetzt. In ihnen setzen die auf eine Emissionskathode (Dynode) auftreffenden Photonen Elektronen frei, die durch eine angelegte Hochspannung kaskadenartig von Dynode zu Dynode beschleunigt werden und dabei immer mehr Elektronen freisetzen, die schließlich als Strom gemessen werden.

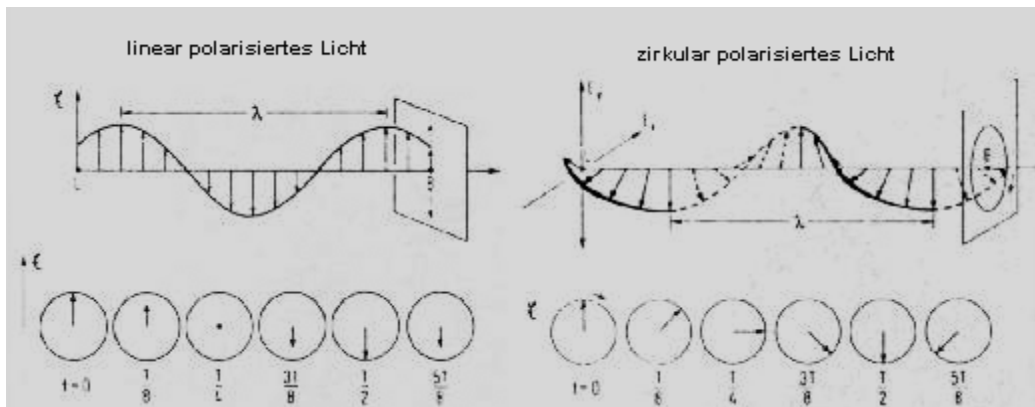
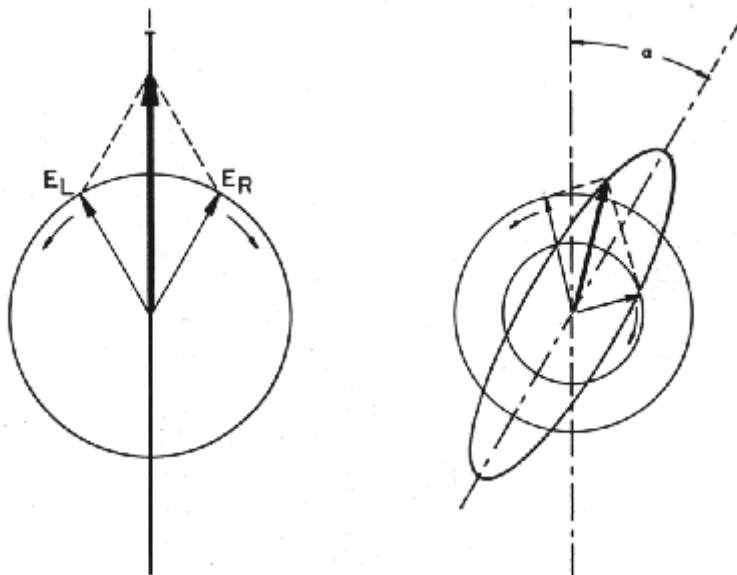
### Messung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Metallgehalt (Mn, Fe, Cu, Zn) von homogenen Proteinlösungen mittels AAS bestimmt. Die Absorptionswellenlängen betrugen 279.5 nm (Mn), 248.3 nm (Fe), 324.8 nm (Cu) und 213.9 nm (Zn). Es wurde eine Luft/Acetylen-Flamme (oxidierend, mager, blau) verwendet. Es wurde eine Kalibrierkurve mit Metallstandardlösungen (AAS-Standardlösungen von Merck), deren Konzentrationen 3 mg/l, 1.5 mg/l und 0.5 mg/l betrugen, aufgenommen und vom Gerät gespeichert, so dass die unbekannten Konzentrationen direkt abgelesen werden konnten. Um das Probenvolumen möglichst klein zu halten und um ähnliche Lö-

sungsmittelbedingungen wie in den Standards zu schaffen, wurde ein Additionsverfahren zur Vermessung der Proben verwendet. Dazu wurden zu 20 µl Proteinlösung je 180 µl der Standardlösungen gegeben und diese Mischung wurde vermessen. Der tatsächliche Metallgehalt der Proben wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung aus der Differenz der Werte der Standards alleine und der Werte der Mischungen berechnet.

### **2.9.2 Zirkularer Dichroismus und magnetischer zirkularer Dichroismus**

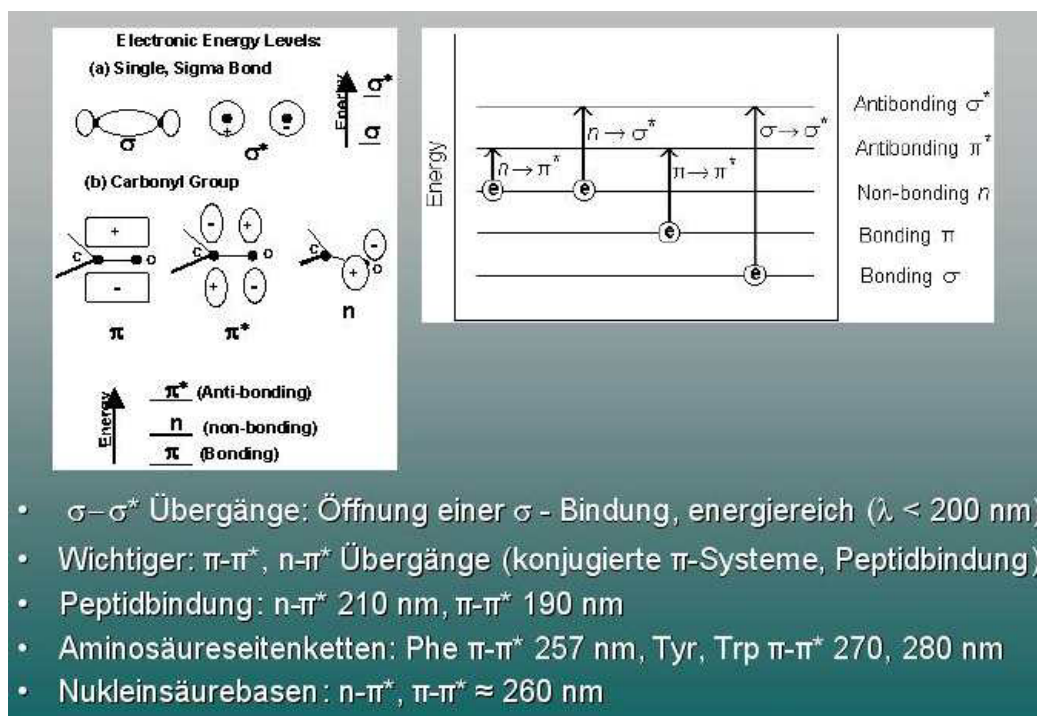
Mit der Methode des zirkularen Dichroismus (CD) kann die Sekundärstruktur von Proteinen und Polypeptiden sensitiv bestimmt werden. Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, in der die unterschiedliche Absorption von rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht, das durch eine asymmetrische Substanz verursacht wurde, gemessen wird. Im einfachsten Fall verursacht eine optisch aktive Substanz eine optische Rotation der Schwingungsebene des zirkular polarisierten Lichts. Die Änderung der optischen Rotation in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird optische Rotationsdispersion (ORD) genannt. Der zirkuläre Dichroismus beschreibt die Differenz der Absorptionskonstanten für rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht durch chirale Moleküle. CD und ORD können über die König-Kramer-Gleichung ineinander überführt werden. Eine anschauliche Darstellung der beschriebenen Phänomene ist in Abb. 9 gegeben.

**A****B**

**Abb. 9:** Schematische Darstellung der verschiedenen Arten polarisierten Lichtes und der durch eine chirale Probe hervorgerufenen Veränderungen des polarisierten Lichtes. (A) Schematisches Diagramm mit der Darstellung des elektrischen Vektors von linear- und zirkular polarisiertem Licht. Darunter ist der Verlauf des elektrischen Vektors entlang der Fortpflanzungsrichtung gezeigt. (B) Links sind die elektrischen Vektoren von links- und rechts zirkular polarisiertem Licht gezeigt. Besitzen diese entgegengesetzt verlaufenden Vektoren die selbe Amplitude, dann überlagern sie sich durch Vektoraddition zu linear polarisiertem Licht. Rechts ist die unterschiedliche Absorption von rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht gezeigt. Dieser Unterschied führt zu einer elliptischen Geometrie der Schwingungsvektoren (Snatzke, 2000).

Als Meßwert wird beim CD meistens die Elliptizität erhalten, die als Verhältniss zwischen kleinerer zu größerer elliptischer Achse definiert ist. Ein axiales Verhältnis von 1:100 ergibt dabei eine Elliptizität von 0.57 Grad, wobei moderne Geräte in der Lage sind im Milligrad-Bereich zu arbeiten. Bei den Maßeinheiten unterscheidet man zwischen molarem CD oder  $\Delta\epsilon$  [Liter mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>] und der molaren Elliptizität ( $\Theta$ ) [grad cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>].

Wie andere Formen der Spektroskopie ist der CD eine optimale Methode zum Beobachten von Konformationsänderungen bei Proteinen (Abb. 10). Im Bereich von 178-230 nm lassen sich Veränderungen des Proteinrückgrates nachweisen. Bei längeren Wellenlängen (240-290 nm) absorbieren die aromatischen Aminosäuren, so daß sich hier die dreidimensionalen Veränderungen des Proteins verfolgen lassen.



**Abb. 10:** Mögliche elektronische Übergänge bei Lichtabsorption für Peptide, Proteine und Nukleinsäuren. Für jeden möglichen elektronischen Übergang sind rechts oben die daran beteiligten Orbitale mit dem entsprechenden Energieniveau dargestellt. Links oben ist die Geometrie der beteiligten Orbitale gezeigt (Snatzke, 2000).

Um aus CD-Messungen die Sekundärstruktur eines Proteins zu erhalten, werden verschiedene Modelle zur Berechnung benutzt. Diese unterscheiden sich in den Datensätzen der benutzten Modellproteine und der rechnerischen Gewichtung der einzelnen Sekundärstrukturen. Der Abgleich durch CD-Messung erhaltener experimenteller Daten mit zugehörigen theoretischen Datensätzen ("fit") erfolgt mittels der "least squares minimization". Bei dieser mathematischen Methode wird die an einer Wellenlänge erhaltene Elliptizität in drei Komponenten aufgespalten,

die den Anteil an  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäuel widerspiegeln (Abb. 11). Um die minimale Abweichung zwischen gemessenen Daten und berechneten Daten zu erhalten, werden quadratische Gleichungen gebildet. Von deren Ableitungen ersten Grades wird das Minimum bestimmt.

$$\begin{aligned}
 (1) \quad & \Theta_T = x_1 \cdot \Theta_h + x_2 \cdot \Theta_s + x_3 \cdot \Theta_r \\
 (2) \quad & s.r.s. = \sum_{i=1}^{ndata} (x_1 \cdot \Theta_{h(i)} + x_2 \cdot \Theta_{s(i)} + x_3 \cdot \Theta_{r(i)} - \Theta_{T(i)})^2 \\
 (3) \quad & \frac{\partial(s.r.s)}{\partial(x_i)} = 0 \\
 (4) \quad & \frac{\partial(s.r.s)}{\partial(x_1)} = 2 \sum_{i=1}^{ndata} (x_1 \cdot \Theta_{h(i)} + x_2 \cdot \Theta_{s(i)} + x_3 \cdot \Theta_{r(i)} - \Theta_{T(i)}) \cdot \Theta_{h(i)} = 0 \\
 (5) \quad & x_1 \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{h(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) + x_2 \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{s(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) + x_3 \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{r(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) = \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{T(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) \\
 (6) \quad & A_{11} = \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{h(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) \\
 (7) \quad & b_1 = \sum_{i=1}^{ndata} (\Theta_{T(i)} \cdot \Theta_{h(i)}) \\
 (8) \quad & x \cdot A = b
 \end{aligned}$$

Abb. 11:

**Mathematische Grundlagen der Sekundärstrukturberechnung bei Proteinen mittels „least squares minimization“.** Gleichung (1) zeigt für den eindimensionalen Fall die Aufspaltung der gemessenen Elliptizität  $\Theta_T$  in drei Anteile, die den Einfluß der helicalen (h),  $\beta$ -Faltblatt (s) und Zufallsknäuel (r) Bestandteile widerspiegelt. Gleichung (2) ist die Grundlage der Minimalisierung der Abweichung zwischen berechneten und gemessenen Datenpunkten. Um das Minimum zu bestimmen wird die 1. Ableitung der Gleichung (2) gleich null gesetzt (3). Nach mehreren Umformungen erhält man Gleichung (4). Man erhält dann drei Gleichungen mit drei Unbekannten (5). Wenn man nun Gleichung (5) als aus einer Matrix (6) und einem Vektor (7) bestehend ansieht, dann wird zu guter letzt die einfach aussehende Gleichung (8) erhalten. S.r.s., sum of residuals squared;  $x_{1,2,3}$  stellt 3 verschiedenen Wellenlängen dar;  $\Theta_T$  ist die gesamte Elliptizität;  $\Theta_h$  ist der Anteil an der Elliptizität durch Helix;  $\Theta_s$  ist der Anteil an der Elliptizität durch Faltblätter;  $\Theta_r$  ist der Anteil an der Elliptizität durch Zufallsknäuel.

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-810 Spektrometer aufgezeichnet. Die Lösungen befanden sich in 1 mm Quarz-Küvetten. Die Einstellungen am CD-Spektrometer wurden folgendermaßen gewählt:



---

Scangeschwindigkeit	100 nm / min
Response	64 ms
Bandbreite	1 nm
Datennahme	1 nm

---

Vor den CD-Messungen wurde die HemF-Lösung gegen 50 mM MES-Puffer (pH 6.0) dialysiert. Drei Spektren wurden jeweils gemessen und dann die Spektren akkumuliert. Als Hintergrund diente der Dialysepuffer, der von den Spektren subtrahiert wurde. Bei Temperatur-abhängigen Messungen wurde die Probe in ein Peltier-Element gestellt.

Für die MCD-Messungen wurde die Probe zwischen zwei Permanentmagneten (5 kG) platziert., so daß das Magnetfeld parallel zum Strahlungsweg ausgerichtet ist. Das Magnetfeld ist so in der Lage eine Asymmetrie im elektronischen Zustand der Probe zu erzeugen, wohingegen CD die räumliche Chiralität eines Moleküls bestimmt. Die Größe des MCD-Signals ist abhängig von der Magnetfeldstärke und von der Temperatur. In dieser Arbeit wurden CD- und MCD-Spektren von HemF gemessen und Differenzspektren gebildet, so daß die abgebildeten Effekte allein durch das Magnetfeld verursacht wurden. Da die gemessenen Signale sehr klein waren, wurden mehrere Spektren aufgenommen und diese dann akkumuliert. Abb. 12 zeigt, wie bei Anwesenheit eines Magnetfeldes der Grundzustand und der angeregte Zustand der Energieniveaus eines Metalls aufgespalten wird. Die Auswahlregeln für zirkular polarisiertes Licht (ZP) in einem homogenen Magnetfeld sind  $\Delta m = +1$  für links ZP und  $\Delta m = -1$  für rechts ZP. Aufgrunddessen wird im MCD Licht mit anderer Wellenlängen absorbiert als beim CD, was im Differenzspektrum ersichtlich wird. Diese Absorption ist temperaturabhängig, weil sich bei niedrigerer Temperatur die Besetzung der Energieniveaus mit Elektronen ändert. Als Folge verstärkt sich bei niedrigen Temperaturen die Absorption, die die Anregung des am wahrscheinlichsten mit Elektronen besetzten Energieniveaus widerspiegelt.

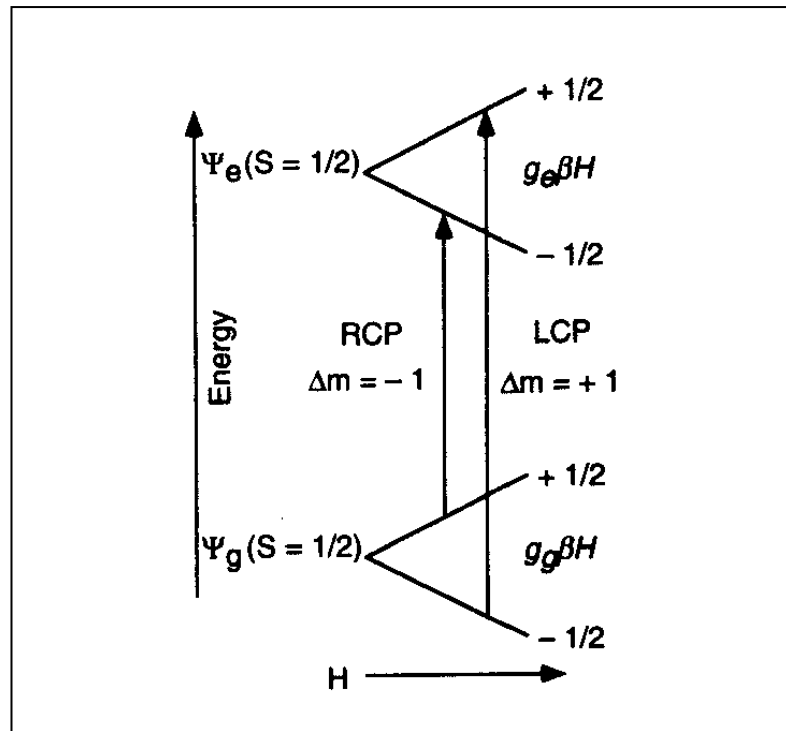


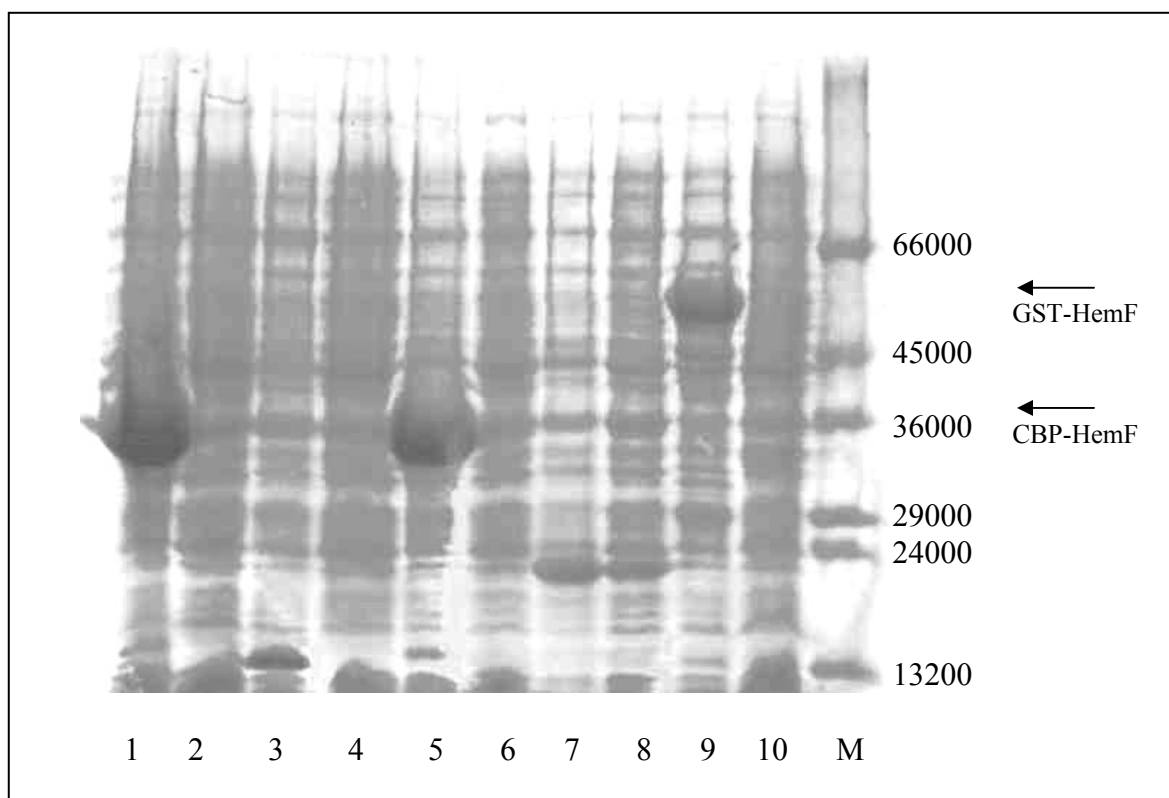
Abb. 12:

**Mechanismus der Erzeugung von MCD-Signalen bei Metallen.** In Anwesenheit eines Magnetfeldes werden der elektronische Grundzustand und der angeregte Zustand aufgespalten. Die durch Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht ausgelösten elektronischen Übergänge sind von unterschiedlicher Energie, da die Auswahlregeln ( $\Delta m$ ) andere sind. H, Magnetfeld; LCP, links zirkular polarisiertes Licht; m, magnetische Quantenzahl; RCP, rechts zirkular polarisiertes Licht; S, Spinquantenzahl des jeweiligen Orbitals;  $\Psi_g$ , Grundzustand;  $\Psi_e$ , angeregter Zustand.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Etablierung eines *Escherichia coli* *hemF*-Expressionssystems

Das *E. coli* *hemF*-Gen wurde in drei verschiedene Expressionsvektoren kloniert (pCal-n, pGEX-6P1, pET5a). Für jedes Expressionssystem wurden fünf Plasmide ausgewählt, die ein *hemF*-Insert der erwarteten Größe enthielten, in den Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) transformiert und Expressionsversuche durchgeführt. Eine deutliche Überproduktion eines HemF-Fusionsproteins in *E. coli* wurde mit den pCal-n und pGEX-6P1-Expressionssystemen beobachtet (Abb.13). Lösliches HemF-Fusionsprotein konnte ausschließlich bei Verwendung des pCal-n Systems erhalten werden. Insgesamt waren aber nur ca. 20 % des rekombinanten HemF-Proteins in der löslichen Fraktion zu finden. Um den Gehalt an löslichem Protein zu steigern, wurden die Temperatur, Zeitpunkt der Induktion, die zeitliche Länge der Induktion, die Konzentration des Induktionsmittels (IPTG) und der Ethanol-Gehalt im Kulturmedium während der Induktionsphase der Zellen methodisch variiert. Als optimal erwiesen sich folgende Bedingungen: Wachstum des Wirts bis zur Induktion bei 37°C, Induktion bei einer  $OD_{578} = 0.5 - 0.7$ , Induktion mit 0.1 % IPTG, Wachstumstemperatur nach der Induktion bei 30°C, Dauer der Induktion 16 h. Mit diesen Bedingungen konnte der Anteil an löslichem HemF auf ca. 30-40 % gesteigert werden.



**Abb. 13:** SDS-PAGE der Überproduktions-Experimente von HemF mit verschiedenen Expressionssystemen in *E.coli*. Aufgetragen wurde die Gesamtzahl der zellulären Proteine des Produktionswirtes. In den Bahnen 1 und 5 ist das überproduzierte CBP-HemF-Fusionsprotein bei einer  $M_r$  von 38000 zu sehen und in der Bahn 9 das GST-HemF-Fusionsprotein bei einer  $M_r$  von 58000.

Bahn M: Dalton Mark VII; die relative denaturierte molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben

Bahn 1+2: pCal-Expressionssystem, Klon 1<sub>5</sub>, nach und vor der Induktion

Bahn 3+4: pCal-Expressionssystem, Klon 2<sub>2</sub>, nach und vor der Induktion

Bahn 5+6: pCal-Expressionssystem, Klon 2<sub>3</sub>, nach und vor der Induktion

Bahn 7+8: pET-Expressionssystem, Klon λ<sub>3</sub>, nach und vor der Induktion

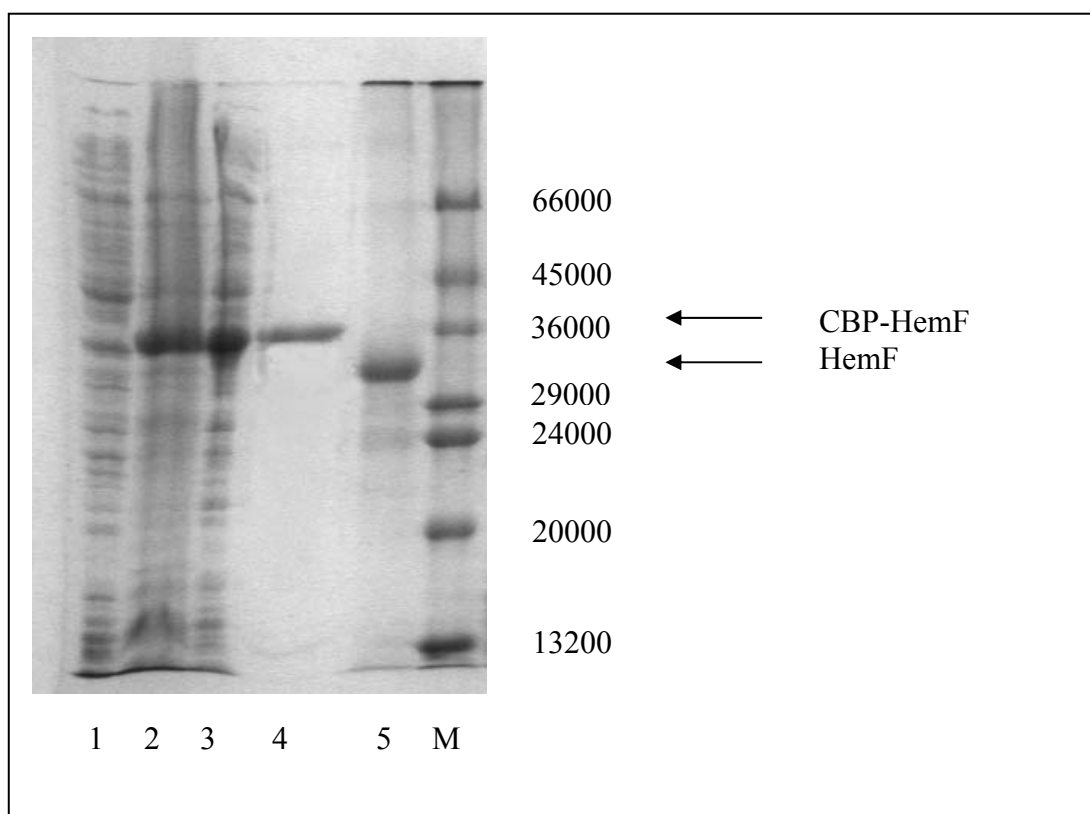
Bahn 9+10: pGEX-Expressionssystem, Klon 2<sub>3</sub>, nach und vor der Induktion

### 3.2 Produktion und Reinigung des rekombinanten HemF aus *Escherichia coli*

#### 3.2.1 Affinitätschromatographische Reinigung unter Verwendung von Calciumionen und EGTA

HemF wurde als N-terminales CBP-HemF Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) in 1 l-Schüttelkolben produziert. Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Ultraschallgerät. In Gegenwart

von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet das CBP-HemF Fusionsprotein an das Calmodulin-Affinitätsmaterial. Die Elution des Proteins erfolgt in einer Schrittelution durch Zusatz von EGTA, das die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen komplexiert, womit eine Strukturänderung des Calmodulins einhergeht und CBP seine Affinität verliert. Für die erfolgreiche Reinigung war die Anwesenheit von 0.1 % Triton X-100 während dem Binden und der Elution des Proteins notwendig, da sonst das Protein weder am Calmodulin gebunden hätte, noch eluiert werden konnte. Anschließend wurde das CBP (4,000) vom Fusionsprotein unter Verwendung von Thrombin proteolytisch abgespalten, so daß ausschließlich HemF als Protein in der Lösung vorlag. Das CBP wurde mittels Dialyse (Ausschlußvolumen 10 kDa) vom HemF getrennt. So erhielt man aus einem Liter Kulturmedium 0.3 mg bis zur apparenten Homogenität gereinigtes HemF (Abb.14).



**Abb. 14: SDS-PAGE der Reinigung der rekombinanten *E. coli* HemF.**

Bahn 1:	Proteinzusammensetzung der <i>E. coli</i> -Zellen vor der Induktion der Produktion
Bahn 2:	Proteinzusammensetzung der <i>E. coli</i> -Zellen nach der Induktion mit IPTG
Bahn 3:	Lösliche Proteine nach der Induktion mit IPTG
Bahn 4:	CBP-HemF nach der Affinitätschromatographie
Bahn 5:	Gereinigtes HemF nach der Abspaltung des CBP
Bahn M:	Dalton Mark VII, die relative Masse der Markerproteine ist angegeben

### 3.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung unter Verwendung Manganionen und dem Calmodulin-Inhibitor W7

Durch die Reinigungsprozedur, wie sie unter 3.2.1 beschrieben ist, ist eine teilweise Inaktivierung von HemF zu erwarten, wenn in *E. coli* HemF zweiwertige Metallionen enthalten sind. Denn während der Elution wird EGTA eingesetzt, das natürlich auch Metallionen von HemF komplexiert. Die Beteiligung von molekularem Sauerstoff an der Enzymreaktion, wie zuvor beschrieben, legte aber eine Metallbeteiligung nahe. Um diese Problematik zu umgehen, mußte deshalb eine neue Reinigungsstrategie entworfen werden, wobei Calmodulin als Affinitätsmaterial beibehalten werden sollte. Das Binden des CBP-HemF Fusionsproteins an das Affinitätsmaterial gelang auch in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$ -Ionen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch eine durch Metallentzug induzierte Strukturänderung des Calmodulin-Proteins am Affinitätsmaterial. Statt EGTA wurde der Calmodulin-Inhibitor W7 (N-6(Aminoethyl)-5-chloro-1-naphtalen Sulfonamid HCl) erfolgreich eingesetzt. Anschließend wurde wie oben beschrieben die Abspaltung des CBP vom Fusionsprotein durchgeführt. Aus einem Liter Kulturmedium konnte so 0.2 mg HemF erhalten werden. Die Qualität der Proteinpräparation war mit der unter 3.2.1 beschriebenen und in Abb. 14 gezeigten identisch. Diese Reinigungsmethode für HemF wurde für die nachfolgenden Arbeiten standardmäßig eingesetzt.

### 3.2.3 Zellzucht im großtechnischen Maßstab

Da die Ausbeute an gereinigtem HemF bei Kultivierung in Schüttelkolben (so wie es unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben wurde) für spektroskopische Analysen und Proteinkristallisationsansätze nicht ausreichte, wurden vier 10 l-, 20 l- und ein 200 l-Fermenter für die Zellanzucht eingesetzt. Der 200 l- und die folgenden 12 l-Fermenter wurden im diskontinuierlichen Rührkessel ohne Zulauf genutzt.

Für den 200 l-Fermenter wurden Vorversuche mit verschiedenen im Vergleich zum LB-Vollmedium preiswerteren Kulturmedien in Schüttelkolben durchgeführt. MMA-Minimalmedium fand dann schließlich im 200 l-Fermenter Verwendung. Die Zellen des 200 l-Fermenters produzierten allerdings keine signifikanten Mengen an rekombinantem CBP-HemF Fusionsprotein. Dieses Ergebnis wird als "scale-up"-Problem interpretiert, da Erfahrungen zeigen, daß bei Maßstabsvergrößerung die Produktionsbedingungen durch schrittweise Experimente neu definiert werden müssen.

Zur großtechnischen Produktion von rekombinantem HemF dienten deswegen 12 l-Fermenter. Für die 12 l-Fermenter wurde LB-Medium benutzt. Aus einem 12 l-Fermenter erhielt man 40-70 g Zellen (Naßgewicht) und 2-4 mg HemF (nach Reinigung).

Um die Ausbeute an Zellen und damit auch an HemF weiter zu steigern, wurde der Reaktormaßstab beibehalten aber dafür wurden die Zellwachstumsbedingungen modifiziert. 10 l-Fermenter wurden nun mit MMA-Minimalmedium ebenfalls im diskontinuierlichen Rührkessel ausgeführt. Dabei wurde die Kohlenstoffquelle (Glucose) kontinuierlich zugeführt und Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffdruck im Reaktor automatisch konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen konnten noch größere Mengen an Zellen erhalten werden (900 g bis 1400 g Zellen pro 10 l-Fermenter). Allerdings zeigte sich zu 90 % proteolytisch fragmentiertes CBP-HemF Fusionsprotein aus diesen 10 l-Fermentern (s. 3.7.4). Auch dieses Ergebnis macht die Abhängigkeit rekombinanter Proteinüberproduktion von den Wachstumsbedingungen sichtbar.

### **3.3 Charakterisierung des gereinigten rekombinanten HemF aus *Escherichia coli***

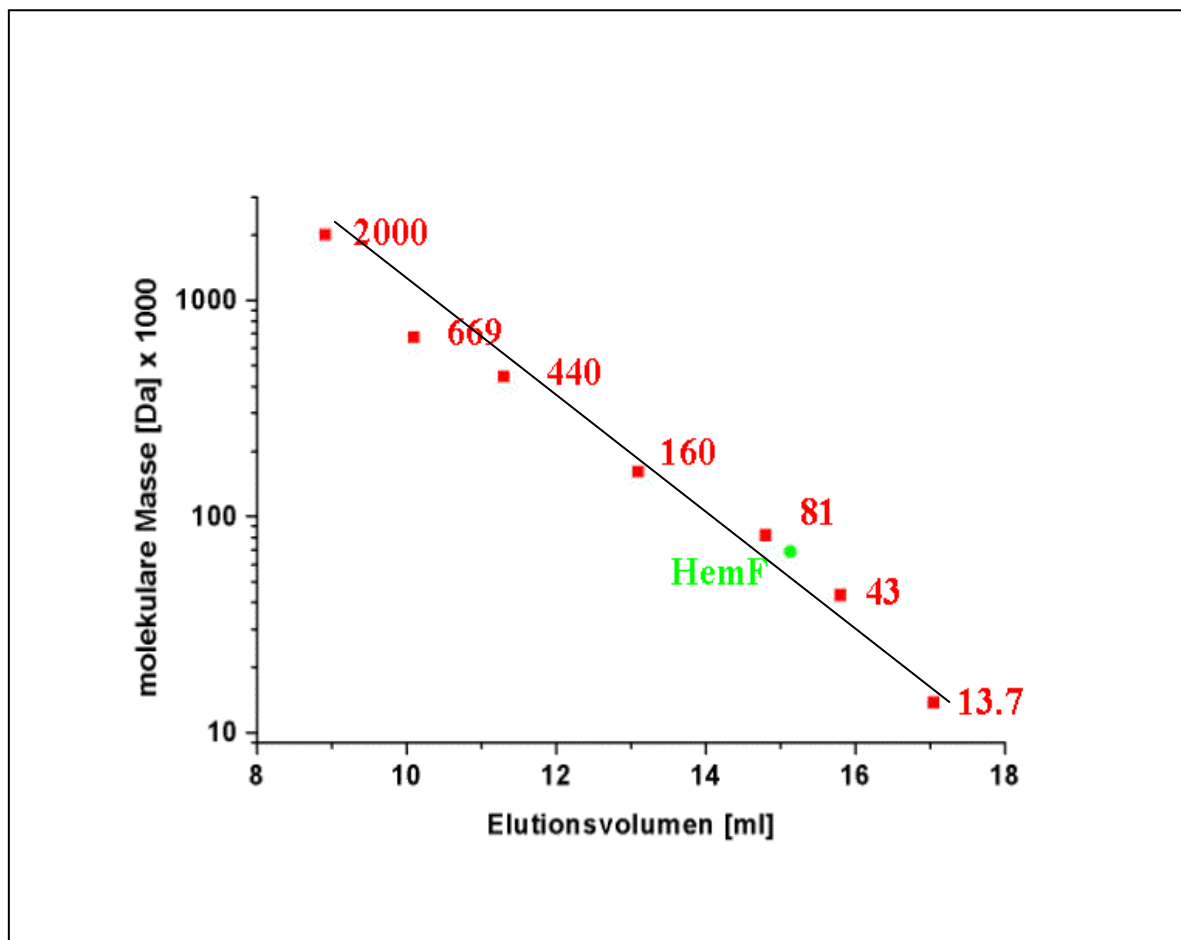
#### **3.3.1 N-terminale Edman-Sequenzierung und ESI-Massenspektrometrie**

Eine N-terminale Sequenzierung von rekombinantem *E. coli* HemF durch Edman-Abbau wurde von Dr. E. Schiltz (Arbeitskreis Prof. Dr. G. E. Schulz, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg) durchgeführt. Folgende Aminosäuresequenz ergab sich: VPRMKPDAHQVKQFLLNLQDT. Diese Sequenz ist mit der Aminosäuresequenz identisch, die sich aus der Gensequenz ableitet. Sie enthält aber drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren. Diese zusätzlichen Aminosäuren entstehen aufgrund der Expression von HemF als Fusionsprotein mit CBP und der anschließenden Thrombin-Spaltungsstelle. Die drei N-terminalen Aminosäuren stammen vom abgespaltenen CBP.

Ein ESI-Massenspektrum von gereinigtem HemF wurde von C. Warth (Universität Freiburg, Analytik-Zentrum, Organische Chemie) aufgenommen. Es ergab ein Molekulargewicht von 34,600 +/- 150 Da (berechnetes Molekulargewicht: 34,586 Da).

### 3.3.2 Gelpermeationschromatographie und native molekulare Masse

Die Gelpermeationschromatographie ergab eine relative native molekulare Masse von 78,000 +/- 5000 für HemF (Abb. 15). Um dieses Ergebnis mittels formunabhängiger Methodik zu überprüfen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. HemF sedimentierte zwischen den beiden Markerproteinen Ovalbumin (43,000 Da) und Holo-Transferrin (81,000 Da). Beide Methoden zeigten, daß *E. coli* HemF als Dimer vorliegt.



**Abb. 15:** Bestimmung der relativen molekularen Masse für HemF mittels GPC. Die relative molekulare Masse der Markerproteine ist in rot dargestellt. HemF wurde bei 15.1 ml eluiert (grün dargestellt). Ribonuklease A (13,700), Ovalbumin (43,000), Holo-Transferrin (81,000), Humanes IgG (160,000), Ferritin (440,000), Thyroglobulin (669,000) und Blue Dextran (2000,000).



---

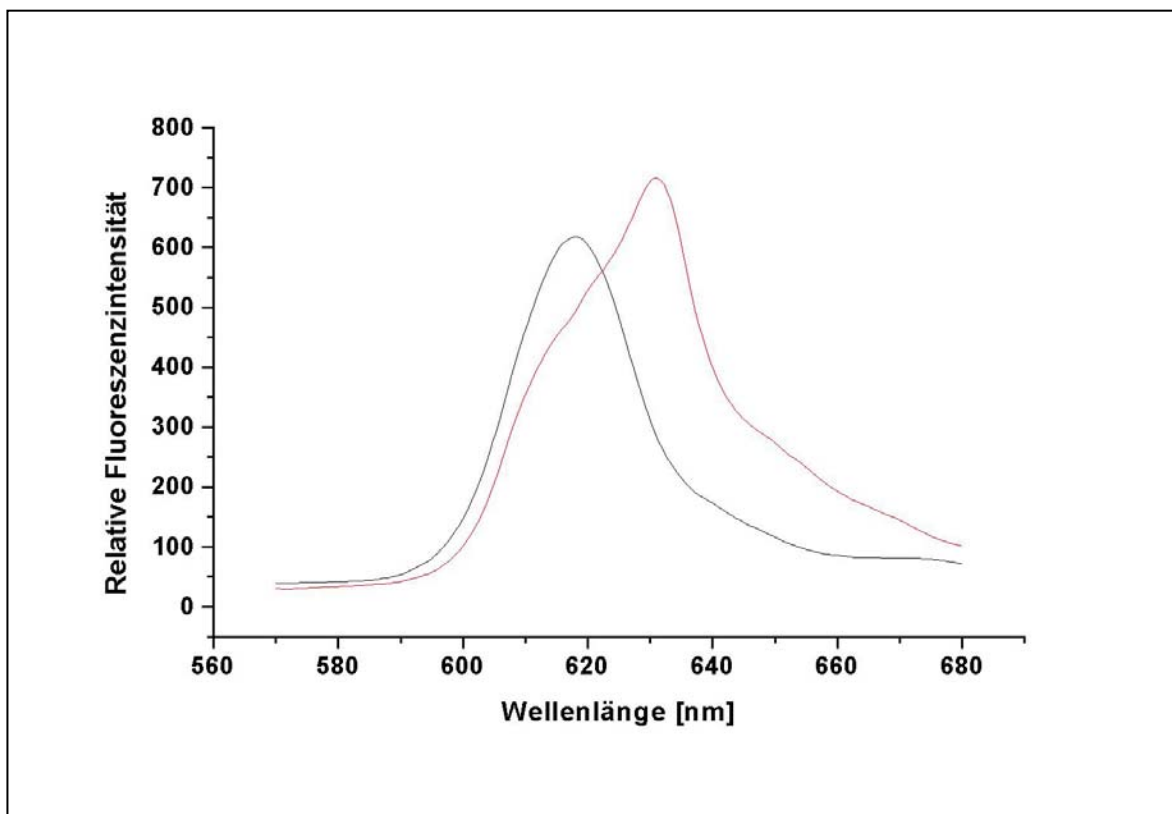
### **3.4 Etablierung eines Aktivitätstest-Systems für *Escherichia coli* HemF**

Das Produkt der enzymatischen Reaktion von HemF ist Protogen. Dieses Produkt wird bei allen Methoden zur Detektierung der enzymatischen Aktivität von HemF zu Proto oxidiert, und anschließend mittels Spektroskopie oder HPLC detektiert.

#### **3.4.1 Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie**

Frühere Arbeiten führten den Produktnachweis photometrisch durch. Deswegen wurde zu Beginn der Arbeit die enzymatische Aktivität von HemF mittels UV/VIS-Photometer nachgewiesen, wobei Proto bei 409 nm absorbiert. Die absolut gemessenen Absorptionen für Proto waren trotz hoher Enzymkonzentrationen (bis zu 1  $\mu\text{M}$ ), hoher Coprogenkonzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) und verlängerter Reaktionszeit (bis zu 16 h) stets am Rande der Messempfindlichkeit.

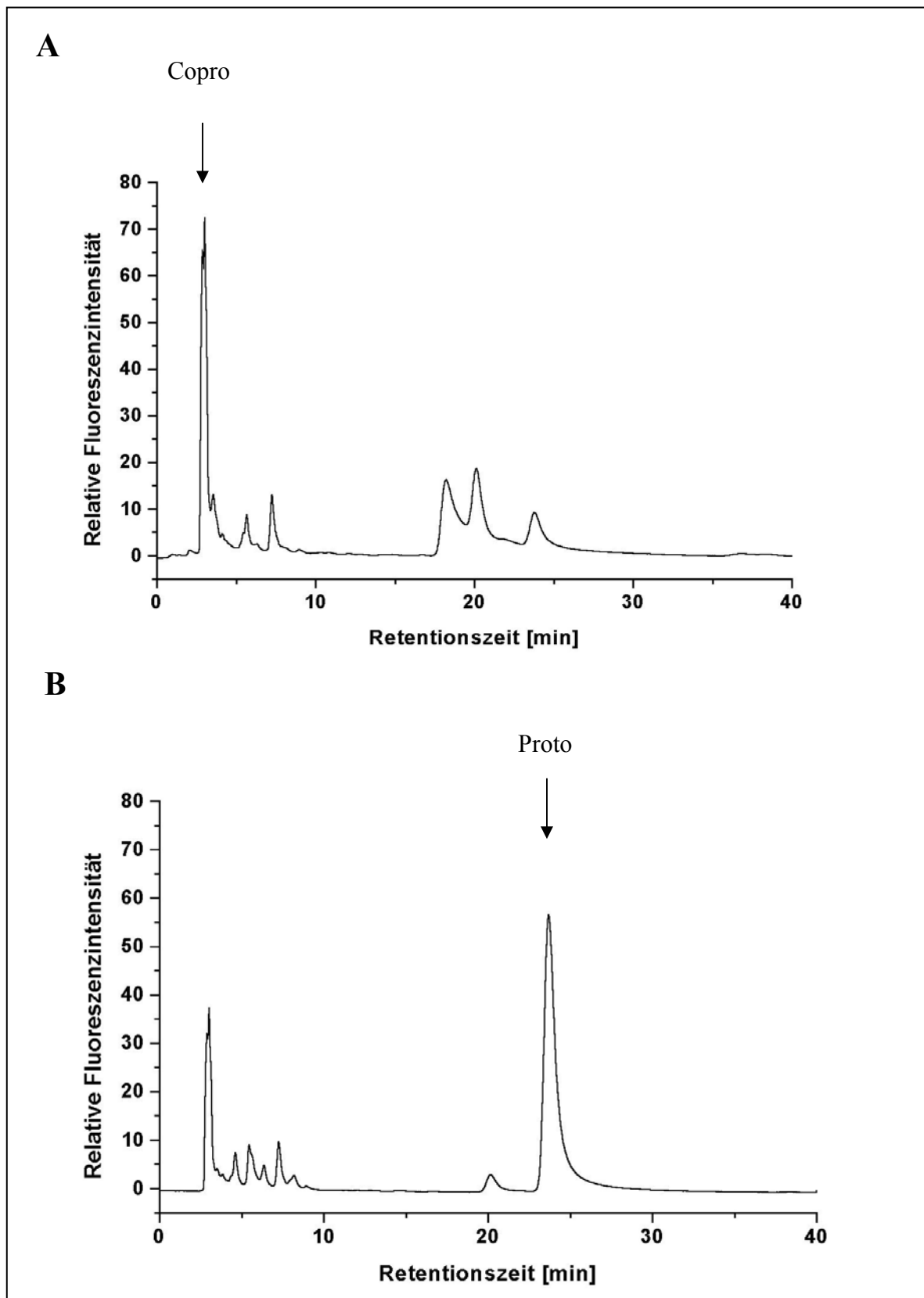
Durch Einsatz eines Fluorimeters konnte die Nachweisgrenze für Tetrapyrrole um den Faktor 1000 zu niedrigeren Konzentrationen hin verschoben werden. Deutlich konnte nun die enzymatische Produktbildung durch HemF verfolgt werden (Abb. 16).



**Abb. 16:** Darstellung der Fluoreszenzspektren von enzymatisch gebildetem Produkt Proto (rot) und dem Substrat Copro (schwarz). Die eingesetzten Lösungen entsprechen den in Material und Methoden angegebenen Standardzusammensetzungen. Obwohl sich die Spektren von eingesetztem oxidiertem Copro und dem enzymatisch erzeugtem Proto (oxidiert) überlagern, kann man eindeutig eine Produktbildung nachweisen. Die Schulter in der Proto Produktkurve (rot) zeigt nicht umgesetztes Substrat Copro.

### 3.4.2 Identifizierung von Tetrapyrrolen mittels HPLC

Nachdem per Fluoreszenzmessung eine Produktbildung bei HemF nachgewiesen werden konnte, erfolgte mittels HPLC der Beweis, daß tatsächlich Proto detektiert wurde. Die HPLC ermöglichte eine sehr genaue Quantifizierung von Proto und seine Trennung von anderen Tetrapyrrolen. Auch hier erfolgte der Nachweis der Elutionsposition der einzelnen Tetrapyrrole mittels Fluoreszenzspektroskopie (Abb. 17). Deutlich zu sehen waren zahlreiche Verunreinigungen in dem von der Firma Porphyrin Products (Logan, USA) bezogenen Coprogen (Abb. 17A). Die gleichen Verunreinigungen zeigen sich auch bei der Analyse der Produktlösung (Abb. 17B).

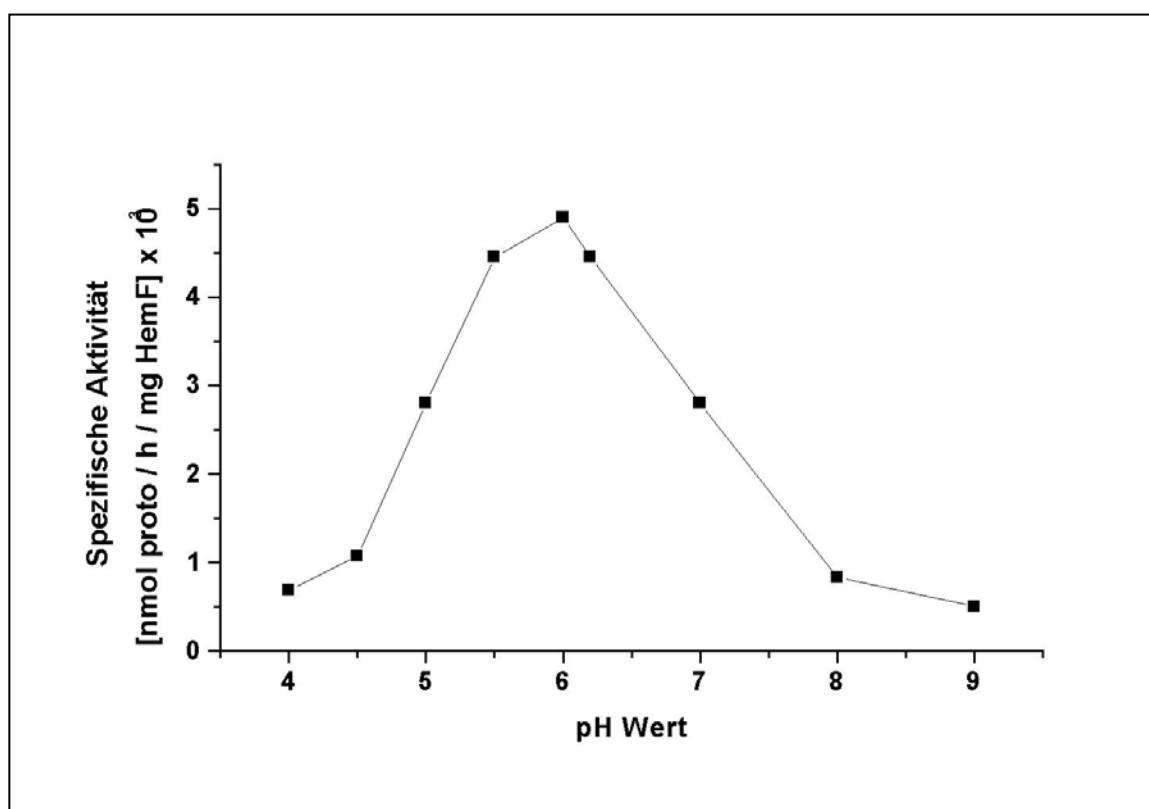


**Abb. 17:** Enzymatische Umwandlung von Coprogen in Protogen durch rekombinantes *E. coli* HemF und die Trennung der Tetrapyrrole mittels HPLC. (A) Die enzymatische Reaktion von HemF wurde sofort durch Addition von Wasserstoffperoxid gestoppt (Reaktionszeit  $t = 0$ ), so

daß keine Umsetzung des eingesetzten Coprogen möglich war. Die wie in Material und Methoden beschrieben vorbehandelte Lösung wurde in ein HPLC-System injiziert und über eine Reversed Phase C18 in 17 % 1M Ammoniumacetat (pH 5.2) in Methanol getrennt. Die Fluoreszenz wurde bei 630 nm detektiert (Anregungswellenlänge 409 nm). Der Copro-Peak kann bei einer Retentionszeit von 3.01 min beobachtet werden. **(B)** Die Bedingungen waren die selben wie unter (A), aber die Reaktion wurde nach 90 min gestoppt. Man sieht deutlich den durch HemF gebildeten Proto-Peak bei einer Retentionszeit von 23.7 min.

### 3.4.3 Das pH-Optimum und die kinetischen Eigenschaften von HemF

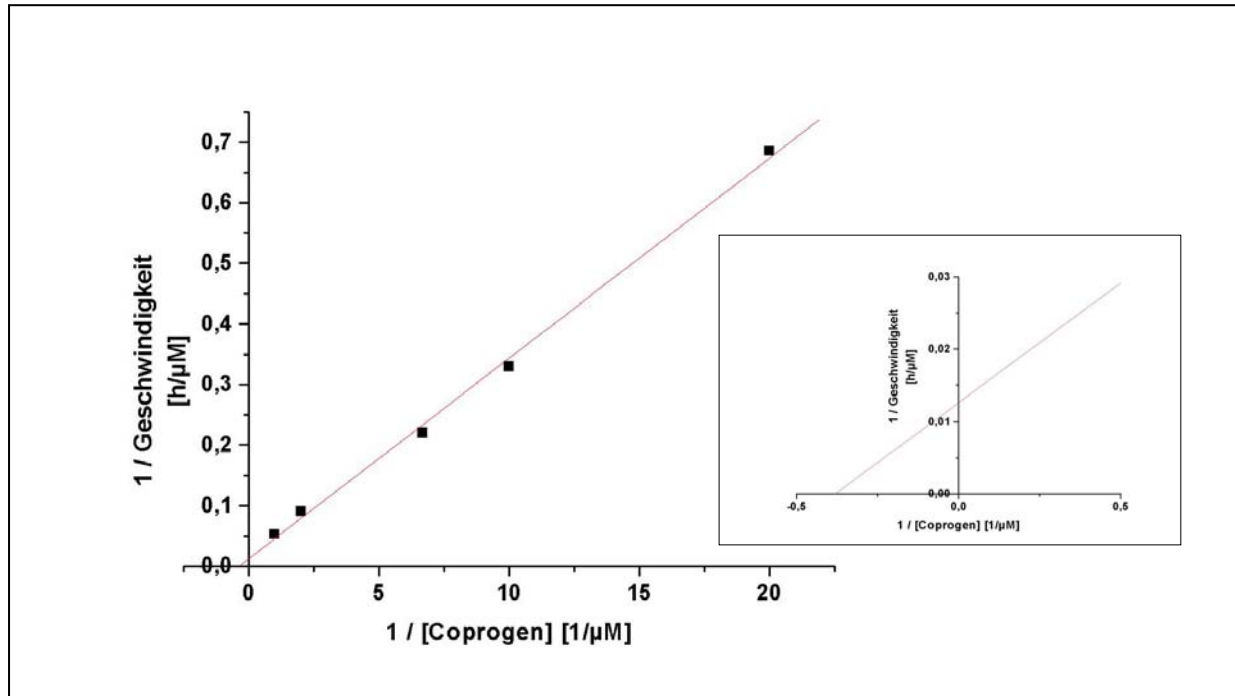
Es wurde das pH-Optimum der Enzymaktivität von HemF bestimmt (Abb. 18). Es lag bei pH 6. Dies war ungewöhnlich, da die pH-Optima eukaryontischer HemF zwischen 7.2 und 8.6 liegen.



**Abb. 18:** Das pH-Optimum der enzymatischen Aktivität von *E. coli* HemF liegt bei 6. Es wurde die spezifische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Es wurden die folgenden Pufferlösungen verwendet: pH 4-5 Ascorbinsäure, pH 5-7 MES, pH 7-9 Tris / HCl. Die Kinetiken wurden bestimmt wie im Methodenteil beschrieben.

Mit einem Fluoreszenzspektrometer wurden Enzym-Kinetiken für verschiedene Coprogen-Konzentrationen gemessen. Die Quantifizierung des gebildeten Proto erfolgte durch Eichung des Tests mit gekaufter Proto-Standardlösungen. Die Berechnung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes erfolgte nach Lineweaver-Burk (Abb. 19), da der Substratüberschuß im Verhältnis zum HemF 80:1 be-

trug (Copeland, 1996). Es ergab sich ein  $K_m$ -Wert von  $2.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0.17 \text{ min}^{-1}$  und ein  $V_{\text{max}}$ -Wert von  $1.3 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für Copro.



**Abb. 19 :** Lineweaver-Burk Diagramm der enzymatischen Aktivität von HemF bei verschiedenen Coprogen-Konzentrationen. Dargestellt ist die reziproke Substratkonzentration gegen die reziproke Geschwindigkeit. Aus dem Achsenschnittpunkt läßt sich  $1 / V_{\text{max}}$  ablesen und aus der Steigung  $K_m / V_{\text{max}}$  ableiten. Zum besseren Ablesen des Achsenschnittpunktes ist der entsprechende Bereich des Diagramms nochmals vergrößert dargestellt.

### 3.5 Der Einfluß von Additiven auf die enzymatische Aktivität

#### 3.5.1 *Escherichia coli* HemF ist ein Mangan-abhängiges Enzym

Bei bisherigen Untersuchungen von eukaryontischem HemF-Proteinen wurde eine Verringerung der Aktivität des Enzyms durch Chelatisierungsreagenzien beschrieben. Die Ergebnisse unterschiedlicher Autoren widersprachen sich jedoch und es gelang nie eine Reaktivierung des Enzyms durch die Zugabe von Metallen (Sano *et al.*, 1961; Hsu *et al.*, 1970). Es wurde sogar publiziert, daß Metalle keinen Einfluß auf die Aktivität von HemF hatten (Yoshinaga *et al.*, 1980b; Medlock *et al.*, 1996). Um eine mögliche Metallabhängigkeit von *E. coli* zu identifizieren, wurde HemF mit verschiedenen Metallchelatoren behandelt und seine Aktivität getestet

(Tab. 4). Das Ergebnis dieser Experimente war, daß alle getesteten Chelatisierungsreagenzien in verschiedenem Maße zu einer Verringerung der Aktivität von HemF führten. Deutlich zu sehen ist der Einfluß von EGTA auf die Aktivität. Dieses Ergebnis bestätigte im Nachhinein die Modifizierung der affinitätschromatographischen Reinigung von HemF. Als einziges Metall rekonstituierte Mangan die Enzymaktivität, Schwermetallionen inaktivierten das Enzym vollständig. Eine vollständige Inaktivierung des Enzyms gelang nur durch doppelte Chelator-Behandlung, zuerst mit EGTA und dann mit o-Phenanthrolin. Nach der vollständigen Inaktivierung von HemF mit Chelatisierungsreagenzien, gelang die Reaktivierung des Enzyms nicht durch einfache Addition von Metallionen. Vor der Behandlung mit Metallionen mußte HemF zuerst mit Harnstoff entfaltet werden, damit eine 20 %ige Reaktivierung des HemF erfolge konnte.

**Tab. 4:** Die Inhibition der Aktivität von HemF durch Addition von Chelatisierungsreagenzien und die Rekonstitution der Aktivität durch Manganionen. Wo angegeben wurde HemF vorbehandelt durch die Addition von Chelatisierungsreagenzien. Als Additive dienten verschiedene Metallionen in angegebener Konzentration. Eine Reaktivierung nach völliger Inaktivierung durch kombinierte EGTA, o-Phenanthrolin Behandlung von HemF gelang erst nach Entfaltung des Enzyms mit Harnstoff. Alle Behandlungen erfolgten wie in Material und Methoden angegeben.

1. Behandlung	2. Behandlung	Additiv	HemF Aktivität [%]
-	-	-	100
-	-	10 mM MnCl <sub>2</sub>	170
10 mM $\alpha,\alpha'$ -Dipyridyl	-	-	60
10 mM o-Phenanthrolin	-	-	50
10 mM EGTA	-	-	30
10 mM EGTA	-	10 mM CoCl <sub>2</sub>	35
10 mM EGTA	-	10 mM NiCl <sub>2</sub>	33
10 mM EGTA	-	10 mM ZnCl <sub>2</sub>	28
10 mM EGTA	-	10 mM FeCl <sub>2</sub>	35
10 mM EGTA	-	10 mM MgCl <sub>2</sub>	30
10 mM EGTA	-	10 mM AlCl <sub>3</sub>	25
10 mM EGTA	-	10 mM CuCl <sub>2</sub>	20
10 mM EGTA	-	0.3 $\mu$ M CuCl <sub>2</sub>	60
10 mM EGTA	-	1 mM MnCl <sub>2</sub>	99
10 mM EGTA	-	10 mM MnCl <sub>2</sub>	180
-	-	200 $\mu$ M HgCl <sub>2</sub>	n.d.
-	-	200 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub>	n.d.
-	-	200 $\mu$ M PdCl <sub>2</sub>	n.d.
10 mM EGTA	10 mM o-Phenanthrolin	-	n.d.
10 mM EGTA	10 mM o-Phenanthrolin	10 mM MnCl <sub>2</sub>	n.d.
-	8 M Urea	-	5
10 mM EGTA + 10 mM o-Phenanthrolin	8 M Urea	10 mM MnCl <sub>2</sub>	20

### 3.5.2 Die Nukleotid-Cofaktoren haben keinen Einfluß auf die HemF-Aktivität

Die sauerstoffunabhängige CPO HemN wurde einer neuen Klasse von Proteinen zugeordnet, die Nukleotide als Cofaktoren enthalten. Eines der gemeinsamen Merkmale dieser Proteine ist ein konserviertes Aminosäuresequenz-Motiv (GGGTP), das als Nukleotid-Bindestelle postuliert wurde. Dieses Motiv findet sich auch in HemF (s. 3.6.2). Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität von HemF überprüft (Tab. 5). Der Zusatz von Nukleotiden zeigte allerdings keinen Einfluß auf die Enzym-Aktivität.

**Tab. 5:** Nukleotide haben keinen Einfluß auf die Aktivität von HemF.

<i>Additiv</i>	<i>HemF Aktivität [%]</i>
-	100
SAM	100
NAD <sup>+</sup>	75
NADH	90
MnCl <sub>2</sub> + NADH	170
MnCl <sub>2</sub>	170

### 3.5.3 Produkt-Inhibition der HemF-Aktivität

Es wurde untersucht, ob das oxidierte Substrat (Copro), das Produkt (Protogen), das oxidierte Produkt (Proto) und ein Proto-Derivat Deuteroporphyrin IX 2,4-Dischwefelsäure (DSA) die Aktivität von HemF beeinflusst (Tab. 6). Bei DSA handelt es sich um ein Copro-Derivat, das statt der Propionatseitenketten an Ring A und B jeweils eine Schwefelsäuregruppe enthält. Weder Copro, noch DSA beeinflussten die enzymatische Aktivität. Dafür zeigten Proto und Protogen eine identische inhibitorische Wirkung, die einem  $K_i = 10.9 \mu\text{M}$  und  $\alpha = 0.5$  für eine gemischte Inhibition (Copeland, 1996) entsprach (Abb. 20).

**Tab. 6:** Der Einfluß verschiedener Tetrapyrrole auf die Aktivität von HemF. Es wurden Enzymtests (Standardbedingungen s. Material und Methoden) mit dem Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  der angegebenen Substanz durchgeführt.

<i>Inhibitor</i>	<i>HemF Aktivität [%]</i>
-	100
Copro	110
Proto / Protogen	50
DSA	95

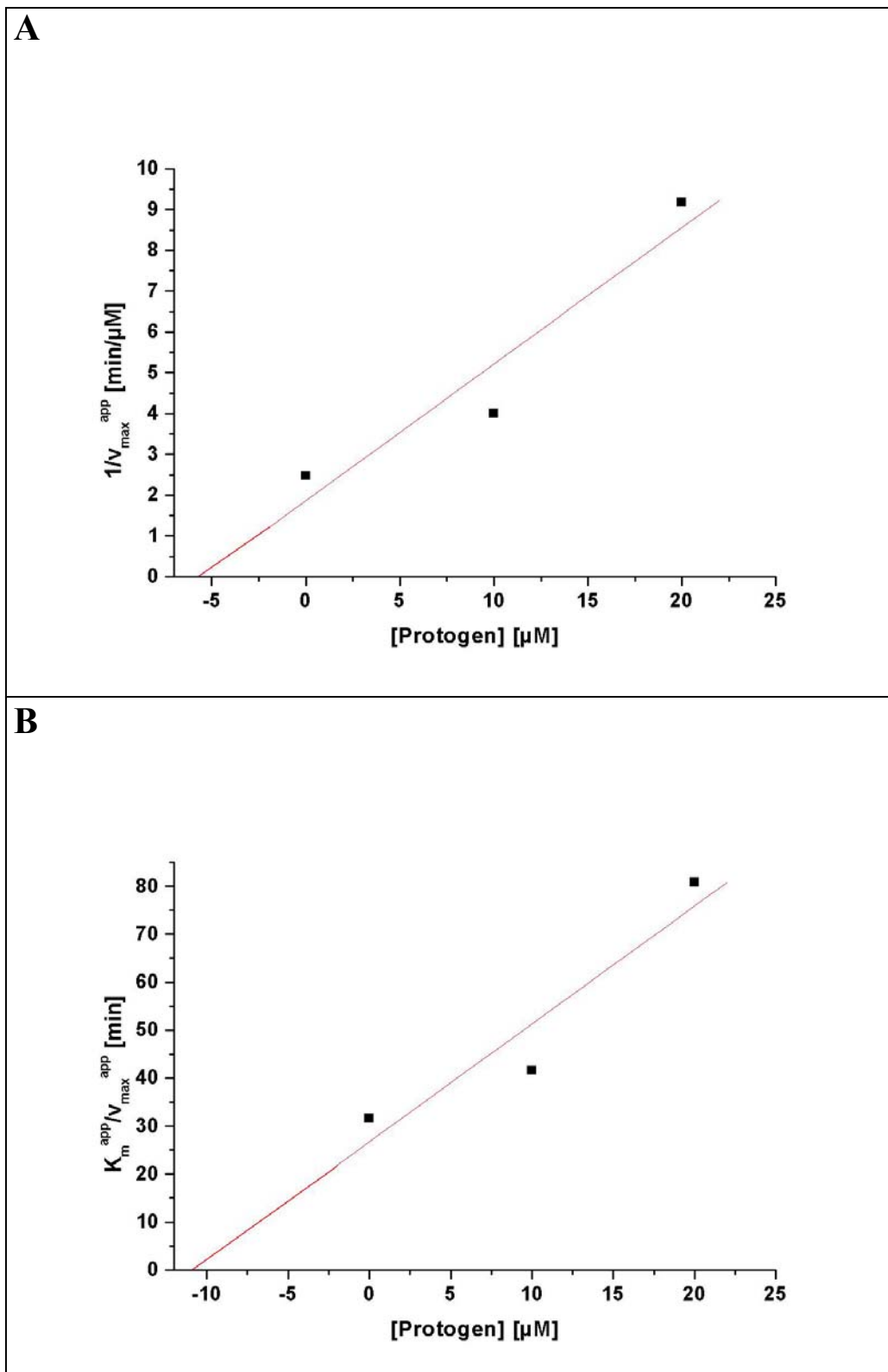


Abb. 20:

**Graphische Bestimmung der  $K_i$ -Konstante für eine gemischte Inhibition.** Zuerst wurde über ein Lineweaver-Burk Diagramm die scheinbaren kinetischen Daten  $K_m^{\text{app}}$  und  $V_{\max}^{\text{app}}$  bestimmt. **(A)** Aus dem extrapolierten Achsenabschnitt der Abzisse kann  $-\alpha K_i$  bestimmt werden. **(B)** Aus dem extrapolierten Achsenabschnitt der Abzisse kann  $-K_i$  bestimmt werden.



### 3.6 Identifizierung katalytisch relevanter Aminosäurereste

#### 3.6.1 Der Einfluß von Aminosäuremodifikationsreagenzien

Um einen ersten Hinweis auf die Aminosäurereste zu bekommen, die für die Enzymaktivität relevant sind, wurde HemF mit einer Vielzahl von Aminosäuremodifikationsreagenzien behandelt (Tab. 7). Es zeigte sich, daß der Zusatz von Reagenzien, die auf Trp, His, Tyr, Cys oder Met wirken, einen Einfluß auf die Aktivität von HemF ausübten.

**Tab. 7:** Der Einfluß von Aminosäuremodifikationsreagenzien auf die enzymatische Aktivität von HemF.

+: Verringerung der enzymatischen Aktivität  
- : kein Einfluß auf die enzymatische Aktivität

<i>Reagenz</i>	<i>mögliche modifizierte Aminosäuren</i>	<i>Einfluß auf Aktivität von HemF</i>
Iodoacetamid	His, Lys, Met, Cys	+
Diethylpyrocarboxylat	His, Tyr, Lys	+
Tetranitromethan	Tyr, Trp, Cys	+
2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid	Trp	+
N-Chlorsuccinimid	His, Trp, Lys, Met	+
Butandion	Arg	-
Pyridoxal-5'-phosphat	Lys	-

#### 3.6.2 Vier Histidin- und ein Tryptophanrest sind essentiell für HemF-Aktivität

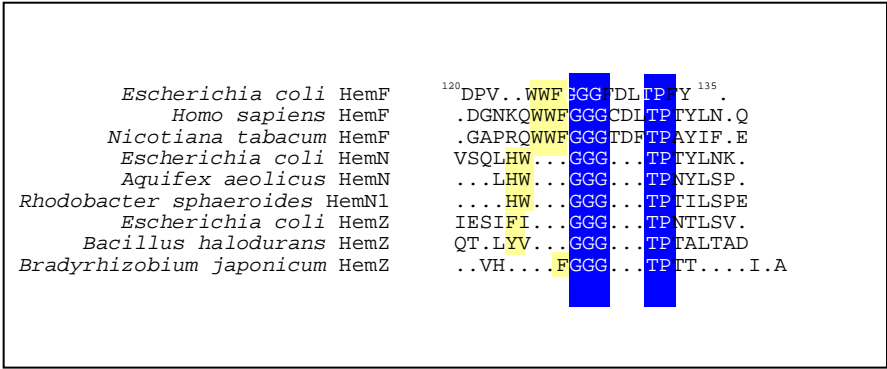
Basierend auf den Ergebnissen der Aminosäuremodifikations-Experimenten, wurden alle hochkonservierten Histidine, Tryptophane und Tyrosine durch Mutagenese ausgetauscht (Abb. 22). Die mutierten Proteine wurden gereinigt und es wurden die kinetischen Daten ermittelt (Tab. 8). Es zeigte sich, daß ein Austausch der vier hochkonservierten Histidine und des Trp 274 zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Alle anderen HemF mit ausgetauschten Aminosäureresten zeigten keinen Unterschied in der Aktivität zum Wildtyp.

**Tab. 8:** **Punktmutationen der vier hochkonservierten Histidine führen zur Inaktivierung von HemF.** Dargestellt ist der Einfluß von Punktmutationen auf die Kinetik der von HemF katalysierten Reaktion. Die angegebenen Aminosäureaustausche wurden mittels gerichteter Mutagenese in das *E. coli hemF* eingeführt. Mutantenzymen wurden chromatographisch gereinigt und die kinetischen Daten bestimmt. Angegeben sind  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert für Coprogen.

<i>Mutation</i>	<i>K<sub>m</sub> [μM]</i>	<i>V<sub>max</sub> [nM/min]</i>
C167S	1.6	3
H96L	n.d.	n.d.
H106L	n.d.	n.d.
H145L	n.d.	n.d.
H175L	n.d.	n.d.
Y135F	3.8	2.6
Y160F	3.5	2.4
Y179F	4.1	2.8
Y213F	3	2.3
Y240F	2	4
Y276F	4.3	3
W36L	4.3	3
W123L	3.3	2.7
W166L	3	2
W274L	n.d.	n.d.
W298L	3.2	2.2

### 3.6.3 Untersuchung des gemeinsamen "GGGTP"-Motivs aller CPOs

Da HemF, HemN und HemZ die gleiche Reaktion katalysieren und damit auch das gleiche Substrat binden müssen, wurde nach Sequenzhomologien gesucht. Durch Aminosäuresequenzvergleiche mit DNASTar konnte ein gemeinsames Motiv (GGGTP) in HemF, HemN und HemZ lokalisiert werden (Abb. 21). Auffällig war auch das Auftreten aromatischer Aminosäuren direkt vor diesem Motiv. Zur funktionellen Charakterisierung des GGGTP-Motivs wurden verschiedene Aminosäureaustausche in HemF vorgenommen (Tab. 9). Die entsprechenden Proteine wurden gereinigt und es wurden kinetischen Daten charakterisiert. Keine der Mutanten zeigte eine Aktivität, die sich deutlich vom Wildtyp unterschied.



**Abb. 21:** Ergebnis des Aminosäuresequenzvergleiches für ausgewählte CPOs, der das GGGTP-Motiv zeigt. Das für die CPO typische GGGTP Aminosäuresequenzmotiv ist blau unterlegt. Gezeigt sind jeweils drei verschiedene HemN, HemZ und HemF. Auffällig ist ebenfalls das Vorhandensein von aromatischen Aminosäuren (gelb unterlegt) vor dem eigentlichen GGGTP Motiv, weshalb auch diese Ziel von Mutagenese-Studien wurden.

**Tab. 9:** Der Einfluß von Punktmutationen auf die Kinetik der von HemF katalysierten Reaktion. Die angegebenen Aminosäureaustausche wurden mittels gerichteter Mutagenese in das *E. coli hemF* eingeführt. Mutantenenzyme wurden chromatographisch gereinigt und die kinetischen Daten bestimmt. Angegeben sind der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert für Copro.

Mutation	$K_m$ [ $\mu$ M]	$V_{max}$ [nM/min]
Wildtyp	2.6	1.3
W124R	3.6	1
G127V	2.1	1.7
T132A	3	2
P133A	3.5	2.5

Escherichia coli.PRO  
Glycine max.PRO  
Pseudomonas aeruginosa.PRO  
Saccharomyces cerevisiae.PRO  
Mus musculus.PRO  
Hordeum vulgare.PRO  
Nicotiana tabacum.PRO  
Homo sapiens.PRO

MMH-----CASIVSAPSYAFPRSGAS---TTPTAISLTKRSMKEP[PSMAKGPVRATVSI][EKE]T[PEANRPETFLR]-----G[VDEAQSSTSVRARREKIM]REAO[DT  
MT-----OD[ENILP]-----SCARS[PSGR]-----REED[DELAR]R[CS]TFMSS[PYTELRLRRRPEDMKITKWEIMIN]ET[QAQ  
MVPKS-----[MASSLITTPSQTLIAPNPAARARSSPA]---AAQVSFSSPLLE[GRAL]---RCARPVAT[KEV][EKEAPITFLRED]SGG-AG---SGSVRE[RE]GWIR[VQGE  
MLTPILSSASCSWTFPTSQ[PFPHWSHSSPSFLTKPLNLPTTESYKTKARPTPENYSFKVQAM][EKEVAVSHKPDALFRESDMG-SNVTSSSSV[RG]REK[R]K[REAO]DS  
MLPKT-----SC[HRATSLGR]-----P[BEED]ELAH[RCS]FMAPVYTDL[ELRLRRPGDMKITKWEIL]ET[QAQ

Escherichia coli.PRO  
Glycine max.PRO  
Pseudomonas aeruginosa.PRO  
Saccharomyces cerevisiae.PRO  
Mus musculus.PRO  
Hordeum vulgare.PRO  
Nicotiana tabacum.PRO  
Homo sapiens.PRO

ICQ[Q]LTA[VDG-A-E]VED[SWQRE-A]GGGGRSRVLRN[GVTE]QAGVNSHVHGEAM[PASA]T[HR]ELAG-RS-----[EAM]GVS[LV]HH[HN]FYPT  
VCSALEA[ADG-GA]QFKEDVWSRP-GGGGGISRVLQDGA[VWEK]AGVNSVYGVMPD[AYRAK]GVPTD-Q-----[KPG]-----PV[FFA]GISSV[TH]PKNFEAPT  
ICAALEA[EDGKA-REA]EDAWERP-AGGGGRT[RVIGD]GALIEKGVNSHVFGDSI[PPSA]SH[FE]LAG-RG-----FOAI[GVSL]V[HN]ENPHVPT  
ITQ[GLE]SIDT-V-KFHADTWIRGNDGGG[ISW]I[ODGTTFE]KGVNSVYIGQLSPA[VSAMKADHKNIRL]PEDPKIGLPVTDGVKTFACGI[SWYTH]VNP[HA]PT  
VCRALAQYD[GVADFTVDRWER-KE]GGG[ITCVLQDGRVFEKAGYSISVHGNLS]E[ANQ]M[GRGKTLK]KDSK--LP-----FIAM[GVSSV]Y[TH]PKNFEAPT  
ICAALEA[ADSGSKRF]EVDVWSRP-GG[VCVH]SRVLQDGNVFEKAGVNSAVIGVC[PRSA]YRAKGA[KN-GAADGH]KAG-----PV[FT]SAG[ISV]Y[TH]PKNFEAPT  
VCLAL[EKADG-GAKFKEDVWSRP-GGGGGH]SSVLQDGA[VFEK]AGVNSVYGVMP[PEAL]RAARPTDNG-NV-----[KPG]-----PI[FFA]GVS[SV]Y[TH]PKNFEAPT  
VCOALAQYD[GANF]SVDRWER-KEGGG[ISCVLQDGVFEKAGYSISVHGNLS]E[AKQ]M[SRGKVLK]TKDGK--LP-----FOAM[GVSSV]Y[TH]PKNFEAPT

Escherichia coli.PRO  
Glycine max.PRO  
Pseudomonas aeruginosa.PRO  
Saccharomyces cerevisiae.PRO  
Mus musculus.PRO  
Hordeum vulgare.PRO  
Nicotiana tabacum.PRO  
Homo sapiens.PRO

SHANVR[ETLAEK]EGAD[PV---WME]GGG[HDITP]FYGFEE[DAI]H[NTAR]D[ICL]FEGEDVY[RYR]YK[WCDE]EYFYLKHRN[EQRG]IGGLFFDD[ILNTB]EDRCFAFMQAV  
LHNRYRYFEETDA[KDAPGAPRQ]WMEGGG[DTLTP]YAI[FEEDV]K[HH]SIQ[QACD]K[FEPT]FYRFRK[WCDDYFYIKHRG]BRGIGGIFDD[ILNDY]DOEM[ILS]FATEC  
SHANVR[ETCEKE]GEE[PV---WME]GGG[HDITP]YAAHEEDCV[H]HVARDACAPFGADVY[RYR]YK[WCDE]RYFHTKHRN[EBRG]IGGLFFDD[ILNQ]M[EDIC]FAFIRAI  
MHNRYRYFEETNQD---GTPQ[TWME]GGADITP[SYL]YEE[DG]LH[Q]LKDALDKHDTALYRFRK[WCDE]EYFYITHRKE[TRG]IGGIFDDYDERDPOEITK[MEV]DC  
MHNRYRYFEET[HEAD---GNTH-WME]GGG[CDITP]RYLNQ[EDAV]H[HTLKE]ACDQ[HPDIY]K[FEK]K[WCDDYFYI]VHRG[BRG]IGGIFDD[IL]DSP[KEA]FRFVKTC  
LHNRYRYFEETDA[KDVPGARPS]WMEGGG[DTLTP]SYLIEEDV[KHH]SVQKQ[OTCDK]E[PSFYR]FRK[WCDDYFYIKHRN]ERGLGGIFDD[ILNDY]DOEM[ILN]FATEC  
LHNRYRYFEETDA[KDAPGAPRQ]WMEGGG[DTLTP]YAI[FEEDV]K[HH]SVQKACD[KFDASFYR]FRK[WCQYDYFYIKHR]DERGIGGIFDD[ILNDY]DOEM[ILS]FSTEC  
IHENRYRYFEET[HEAD---GNKQ-WME]GGG[CDITP]TYLNQ[EDAV]H[HTLKE]ACDQ[HPDIY]K[FEK]K[WCDDYFYI]AHRG[BRG]IGGIFDD[IL]DSP[KEA]FRFVKQSC

Escherichia coli.PRO  
Glycine max.PRO  
Pseudomonas aeruginosa.PRO  
Saccharomyces cerevisiae.PRO  
Mus musculus.PRO  
Hordeum vulgare.PRO  
Nicotiana tabacum.PRO  
Homo sapiens.PRO

GKGYTDA[YLTE]V[ER]RRK[AMAYG]E[RE]RN[Q]LYRRGRVVEFN[LV]WDRGTLFGLQ[T-GGR]TEST[IM]SYPLV[RWEYD]YQPKDGSPEALSE-FITKVRDWY  
ANSVIPAYLEPT[TEKR]KDI[PFNDH]QKAWQOLRRGRVVEFN[LV]YDRGTTEGLKT-GGR[TE]ST[IL]VSLP[ITARWEYD]HKPEEGSEEWKILLDACINPKEMI  
GDAYLDA[YLPIV]Q[RKHT]PTDERQ[RE]QAYRRGRVVEFN[LV]EDRGTLFGLQ[S-GGR]TEST[IM]SLPQ[VRWG]YD[W]KPE[PGSE]EARLTTEYFLADRQWTLAQOP  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE.PRO FDAFLPSYLTIVK[RKDM]PYTKEEQ[QWQAI]RRGRVVEFN[LV]YDRGTOFGIRTPGSRV[ESTIM]SLSE[HAS]WLYNHH[PAGSR]EAKILLEVTTKPREWY---K  
AEAVVPSYVIVK[KHCD]DSYTPRDKLWQOLRRGRVVEFN[LV]YDRGTLFGLFTPGSR[ESTIM]SLP[ITARWEYH]SP[EN]SK[EAE]ILEVL[RHPK]DWY---H  
AGSVIPAYLPT[TEKR]KDTPTFNEEQ[KAWQY]RRGRVVEFN[LV]YDRGTTEGLKT-GGR[TE]ST[IL]VSLP[ITARWEYD]HKPEEGSEEWKILLDACINPKEMI  
ANSVIPAYLPIVERK[RKDTPT]TDKHKAWQOLRRGRVVEFN[LV]YDRGTTEGLKT-GGR[TE]ST[IL]VSLP[ITARWEYD]HKPEEGTEEWKILLDACINPKEMI  
ARAVVPSYLP[IVK]KHCD[SF]TPQEKLWQOLRRGRVVEFN[LV]YDRGTLFGLFTPGSR[ESTIM]SLP[ITARWEYH]SP[EN]SK[EAE]ILEVL[RHPK]DWY---R

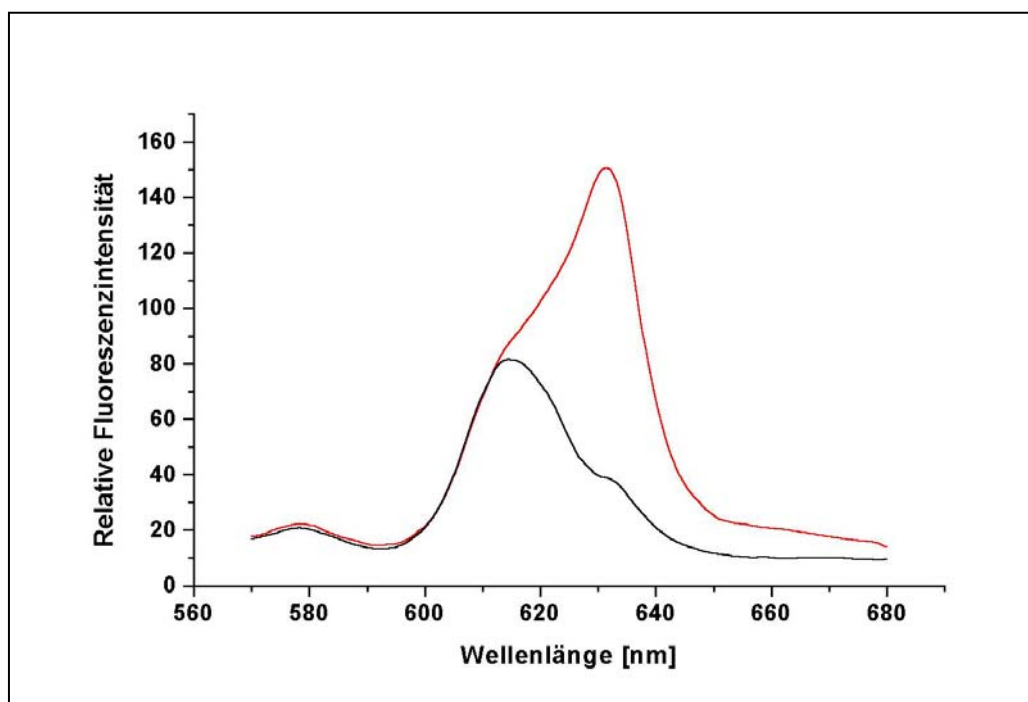
Decoration 'HemF-Align': Shade (with solid black) residues that match the Consensus exactly.

Abb. 22: Aminosäuresequenzvergleich der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidasen aus den Organismen *E. coli*, *G. max*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *M. musculus*, *H. vulgare*, *N. tabacum* und *H. sapiens*. Dieser Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm DNASar ausgeführt. Die mutierten Histidine sind durch rote, die mutierten Tryptophane durch grüne, die mutierten Tyrosine durch blaue Pfeile und das einzige mutierte Cysteine durch einen gelben Pfeil gekennzeichnet. In violett sind die Punktmutationen des "GGGT"-Motivs dargestellt.

### 3.7 Untersuchungen zum Mechanismus

#### 3.7.1 Anaerobe Enzymaktivität von HemF

HemF wurde bisher in der Literatur als strikt aerobes Enzym angesehen, da es den Autoren nicht gelungen war unter anaeroben Bedingungen eine Aktivität nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine anaerobe Aktivität von aerob produziertem HemF nachgewiesen. Die Aktivität betrug dabei anaerob 50 % der aeroben Aktivität. Zur Beantwortung der Frage, ob HemF tatsächlich Sauerstoff für seine Aktivität benötigt, wurden folgende Experimente durchgeführt. Zum einen wurden die HemF produzierenden *E. coli*-Zellen strikt anaerob kultiviert und zum Anderen wurde diese Anzucht semi-anaerob durchgeführt (Tab. 10). Die daraus gewonnenen Proteine wurden anaerob gereinigt und auch anaerob einem Aktivitätstest unterzogen (Abb. 23). Das strikt anaerob produzierte HemF zeigte keine Aktivität. Daraus wurde gefolgert, daß HemF ein sauerstoffabhängiges Enzym ist. Das semi-anaerob kultivierte Enzym zeigte nach anaerober Reinigung im anaeroben Test Aktivität. Dies deutet auf keine direkte quantitative Beteiligung von Sauerstoff an der Katalyse hin, wie z.B. eine Hydroxylierungsreaktion voraussetzt. Ungeklärt bleibt nach diesen Experimenten, wie der Sauerstoff am Enzym gebunden wird und dann in die enzymatische Reaktion einfließt. So ist vorstellbar, daß der Sauerstoff am Enzym ein Radikal erzeugt.



**Abb. 23:** Anaerobe enzymatische Aktivität von HemF. Dargestellt sind zwei Fluoreszenzspektren von 570-680 nm (Anregungswellenlänge 409 nm, Spaltbreiten 5 nm) von Reaktionsprodukten einer HemF-Katalyse. Produkt des teilweise anaerob produzierten HemF ist rot gezeichnet und als oxi-

dierte Form des Produkts Proto identifiziert worden. Schwarz dargestellt ist das Produkt der Reaktion des strikt anaerob produzierten HemF, das sich als oxidierte Form des Substrats Copro zeigt.

**Tab. 10:** Enzymaktivität von anaerob und semi-anaerob produziertem HemF.

<i>Kulturtyp</i>	<i>Vorkultur I</i>	<i>Vorkultur II</i>	<i>Hauptkultur</i>	<i>Enzymreinigung</i>	<i>Enzymaktivität</i>	
					+ O <sub>2</sub>	- O <sub>2</sub>
Aerob	+ O <sub>2</sub>	-	+ O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	100 %	50 %
Anaerob	+ O <sub>2</sub>	- O <sub>2</sub>	- O <sub>2</sub>	- O <sub>2</sub>	-	n.d.
Semi-Anaerob	+ O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	- O <sub>2</sub>	-	30 %

### 3.7.2 Der Einfluß von Radikalfängern auf die Aktivität von HemF

Diese Experimente sollten erste Hinweise auf das Vorhandensein eines Radikals während der enzymatischen Reaktion geben. Nach dem Beweis für die anaerobe Aktivität von aerob gereinigtem HemF (3.7.1), wurde versucht diese anaerobe Aktivität durch Addition von Radikalfängern zu eliminieren (Tab. 11). Die Ergebnisse zeigten, daß nur Radikalfänger mit kleiner Molekülgröße die Enzymaktivität signifikant verringerten, aber nicht vollständig auslöschten. Die sterische Abhängigkeit des Einflusses der Radikalfänger kann ein Hinweis sein, daß das katalytische Zentrum mit einem möglichen Radikal im Innern des Proteins verborgen liegt.

**Tab. 11:** Der Einfluß von Radikalfängern auf die Aktivität von HemF unter anaeroben Bedingungen. Nur Dimethylthioharnstoff und DMSO verringern signifikant die Aktivität von HemF. Nähere Angaben zur Durchführung s. Material und Methoden.

<i>1. Behandlung</i>	<i>2. Behandlung</i>	<i>HemF Aktivität [%]</i>
-	-	100
anaerob	-	50
anaerob	Tryptophan	55
anaerob	Mannitol	40
anaerob	Ascorbinsäure	45
anaerob	Dimethylthioharnstoff	20
anaerob	DMSO	10

### 3.7.3 Nachweis von Peroxid als Produkt der HemF-Katalyse

Falls Sauerstoff am Enzym gebunden wird, um dann während der Reaktion als Elektronenakzeptor zu fungieren müßte in stöchiometrischen Mengen Peroxid als Produkt gebildet werden. Um dies zu überprüfen, wurden zwei verschiedene photometrische Peroxid-Nachweistests (mit Thiamin und 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) durchgeführt (Tab. 12). Diese

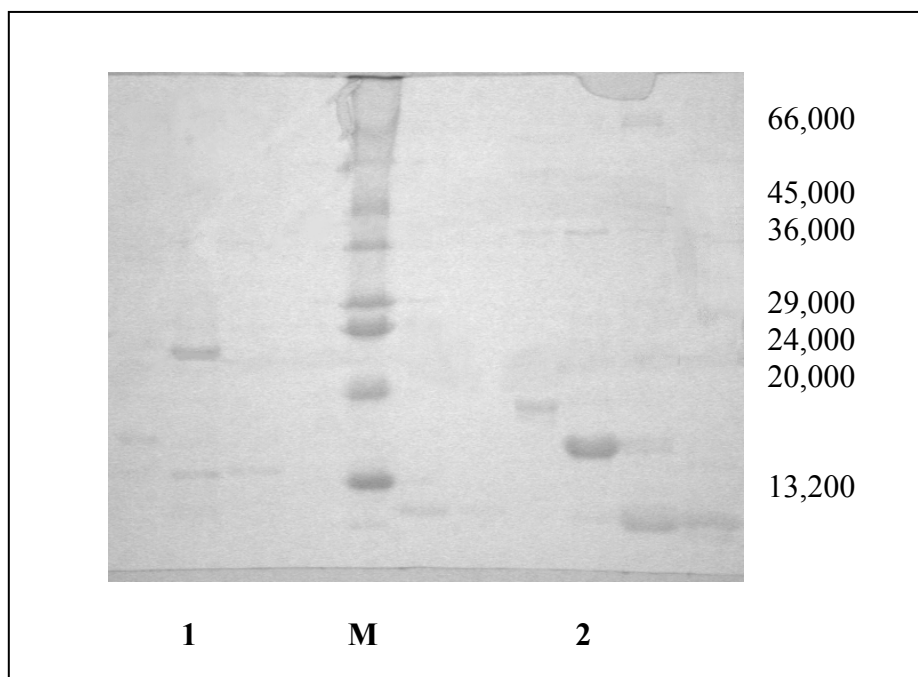
Tests verliefen positiv. Es wurde Peroxid während der Reaktion gebildet, was auf einen stöchiometrischen Verbrauch des Sauerstoffs hinweist.

**Tab. 12:** Photometrischer Nachweis der Peroxidbildung während der von HemF katalysierten Reaktion mit 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) und Thiamin. Es wurde ein Standard-Enzymtest verwendet wie in Material und Methoden beschrieben, in dem zusätzlich mM ABTS bzw. mM Thiamin zugegeben wurden. Als Hintergrundkontrolle dienten die Reaktionsansätze ohne HemF.

<i>Nachweis-Reagenz</i>	<i>Absorption bei 414 nm [AU]</i>	<i>Relative Fluoreszenz bei 440 nm</i>
ABTS	0.5	
ABTS ohne HemF	0.33	
Thiamin		95
Thiamin ohne HemF		5

### 3.7.4 Fragmentierung von HemF

Es konnte eine Fragmentierung von HemF in verschiedenen Proben mittels SDS-PAGE beobachtet werden (s. 10 l-Fermenter (3.2.3), Proteinkristallisation (3.9)). Diese Spaltung des CBP-HemF führte zu zwei Fragmenten mit einer Größe von 21,000 Da bzw. 17,000 Da. Bisher konnte nur das N-terminale 21,000 Da große Fragment sequenziert werden. Mit den CBP-HemF-Fragmenten aus den 10 l-Fermentern (3.2.3) wurden verschiedene Reinigungsschritte durchgeführt (Calmodulin-Affinitätschromatographie, Kationenaustauscher, GPC) (Abb. 24). Die enzymatische Aktivität der gereinigten Fragmente wurde getestet, aber diese Fragmente waren inaktiv. Die Größe der beiden Fragmente läßt auf eine Spaltung des HemF im Bereich der vier hochkonservierten Histidine schließen, die essentiell sind für die Katalyse. Solche Fragmentierungen sind typisch für Enzyme, die stabile Radikale enthalten. Auch die Fragmentierung von HemF im Bereich des vermuteten katalytischen Zentrums weist auf die Bildung eines Radikals im Enzym hin.



**Abb. 24:** **SDS-PAGE Darstellung der beiden gereinigten HemF-Fragmente.** Calmodulin-Affinitätschromatographie, Kationenaustauschchromatographie an MonoS und GPC an Superdex 200 liegen das 21,000 Da-Fragment (Bahn 1) und das 17,000 Da-Fragment gereinigt vor.  
 Bahn M: Dalton-Mark VII, Markerproteine, relative Masse in Da angegeben.  
 Bahn 1: GPC-Fraktion 19.  
 Bahn 2: GPC-Fraktion 46.

### 3.8 Spektroskopische Untersuchungen

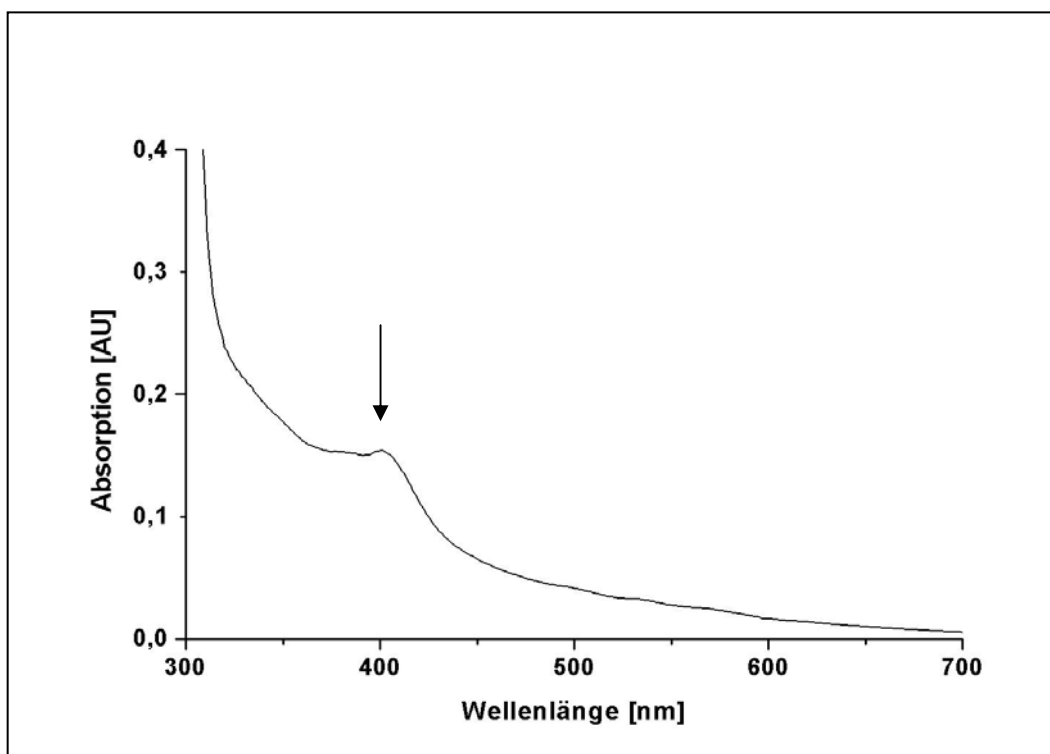
Die bisher in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wiesen auf die Beteiligung eines Metalls an der HemF-Katalyse hin. So konnte durch Chelatisierungsreagenzien die Aktivität von HemF inhibiert (3.5.1) und nur durch Manganzusatz wieder rekonstituiert werden (3.5.1). Vier hochkonservierte Histidine, als potentielle Metall-Koordinationsstellen, sind essentiell für die katalytische Aktivität (3.6.3) schließlich wird Peroxid während der Reaktion gebildet, was das Binden von Sauerstoff über ein Metall am Enzym voraussetzt (3.7.3). Mittels spektroskopischer Methoden sollten der Metallgehalt von HemF bestimmt werden.

#### 3.8.1 UV / VIS-Spektroskopie

Die Messung der Absorptionen im UV/VIS-Bereich kann Hinweise auf mögliche Cofaktoren geben. Ein Spektrum von HemF im sichtbaren Bereich des Spektrums ist in Abb. 25 darge-



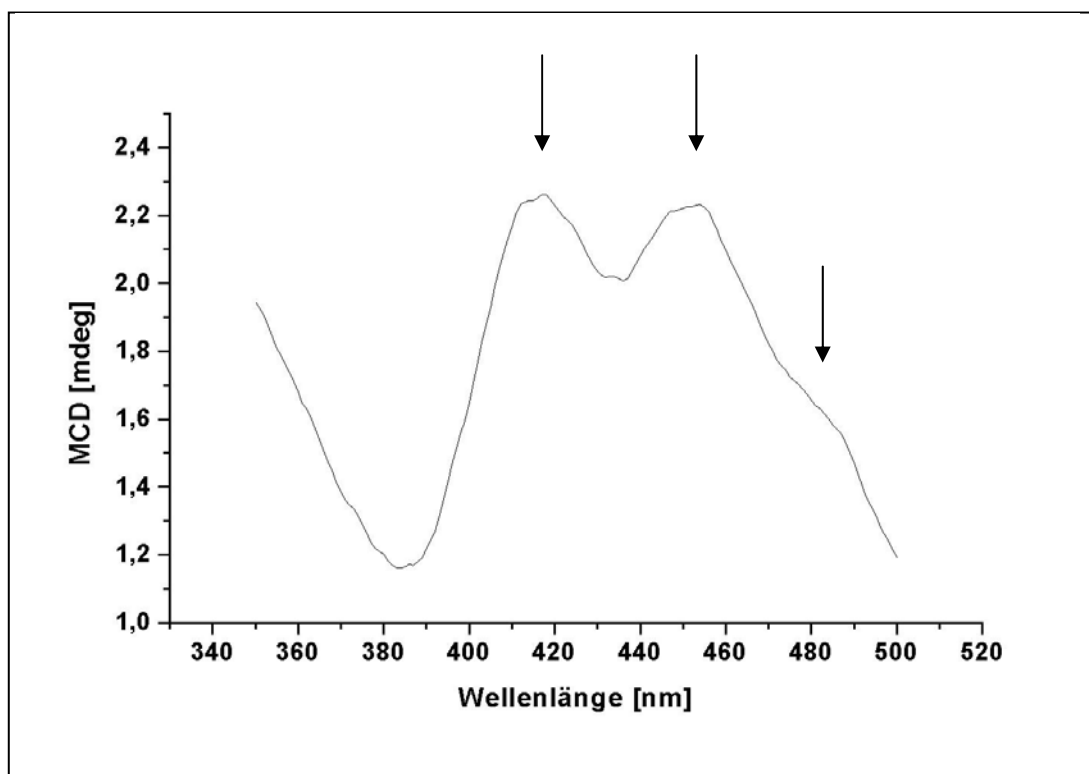
stellt. Es ist ein deutliches Absorptionmaximum bei 406 nm erkennbar. Dieser Absorptionsbereich ist typisch für enzymgebundene Metalle oder Tetrapyrrole.



**Abb. 25:** UV/VIS-Spektrum von HemF. HemF (ohne CBP) lag im Kinetikpuffer in einer Konzentration von 0.7 mg/ml vor. Die Absorption des Kinetikpuffers wurde bereits als Vergleich abgezogen. Zu erkennen ist ein Absorptionmaximum bei 406 nm.

### 3.8.2 Magnetischer zirkularer Dichroismus (MCD)

Nach den ersten spektroskopischen Hinweisen auf enzymgebundene Metalle als prosthetische Gruppe in HemF, wurden MCD-Untersuchungen durchgeführt. Ein MCD-Peak ist bei Metallen nur bei der Wellenlänge zu beobachten, wo auch eine Absorption vorhanden ist. Die hier gezeigten Peaks bei 418, 454 und 487 nm (Abb. 26) sind sehr typisch für enzymgebundene Metalle (Abraham *et al.*, 2001; Larrabee *et al.*, 1997; Dhawan *et al.*, 1999; Randall *et al.*, 2000; Mimuro *et al.*, 2000). Allerdings kann keine Aussage über die Natur des Metalls getroffen werden, da die Absorptionen sehr stark von der elektronischen und sterischen Umgebung des Metalls abhängen. Eindeutig ist jedoch, daß Metall in HemF vorhanden ist.



**Abb. 26:** MCD-Spektren als Nachweis für Mangan in HemF. Dargestellt sind akkumulierte MCD-Spektren von 350 nm bis 500 nm., die bei ca. -10°C aufgenommen wurden. HemF lag in einer Konzentration von 180 µg/ml in 40:10 Methanol:Ethanol vor. Zu sehen sind drei Peaks bei 418, 454 und 487 nm (Pfeile). Die Spektren stellen Differenzspektren dar, bei denen das CD-Spektrum vom MCD-Spektrum bereits abgezogen wurde.

### 3.8.3 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Eine weitere Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Metallen in Proteinen stellt die AAS dar. Es wurden AAS-Untersuchungen zum Nachweis von Fe, Cu, Zn und Mn (wie in Material und Methoden beschrieben) durchgeführt. Mit dem AAS konnte kein Fe, Cu oder Zn in HemF nachgewiesen werden. Aber es konnte Mn quantifiziert werden. Es wurde ein Manganatom je zwei HemF-Dimere gefunden. Dies stellt ein sehr ungewöhnliches und unwahrscheinliches Manganionen-Enzym-Verhältnis dar. Sehr wahrscheinlich führt die starke rekombinante Überproduktion von HemF, wovon nur ein Teil des produzierten Proteins löslich war, zu einem unvollständigen Einbau des Mangans in das Enzym. Diese Tatsache wird auch die stimulierende Wirkung von Mangan auf die enzymatische Aktivität von chelatorunbehandeltem HemF (100 % → 180 %) erklären (3.5.1).

### 3.8.4 Zirkularer Dichroismus (CD)

Ein erster Ansatz zur Struktur-Funktionsbeziehung von HemF war die Analyse mittels CD, um die Verteilung der Sekundärstrukturelemente aufzuklären. Die Berechnung der Sekundärstrukturverteilung erfolgte nach fünf verschiedenen Modellen, die vom benutzten Programm "Dicroprot" vorgegeben waren. Die gemessenen Daten konnten am besten mit der Methode nach Bolotina (Abb. 27) mit den theoretischen Grundlagen in Übereinstimmung gebracht werden. Damit konnte folgende Sekundärstruktur-Zusammensetzung von HemF bestimmt werden:

Helix	56 %
$\beta$ -Faltblatt	17 %
Turn	23 %
Coil	3 %

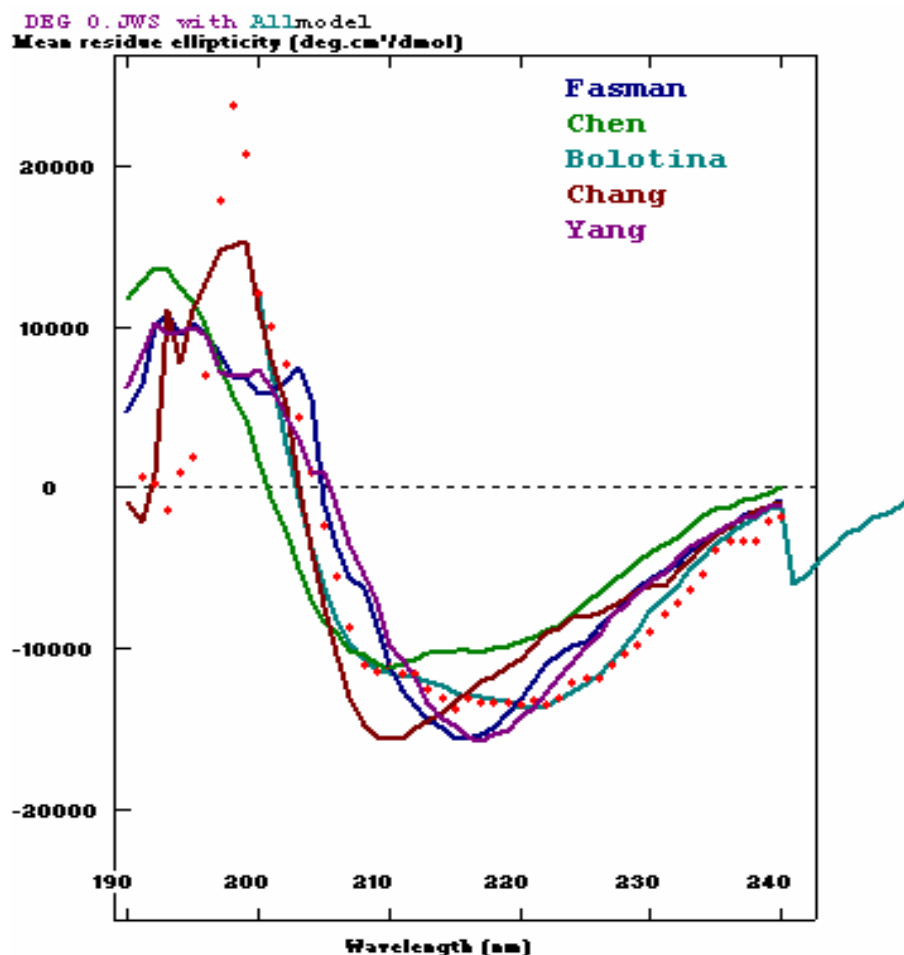
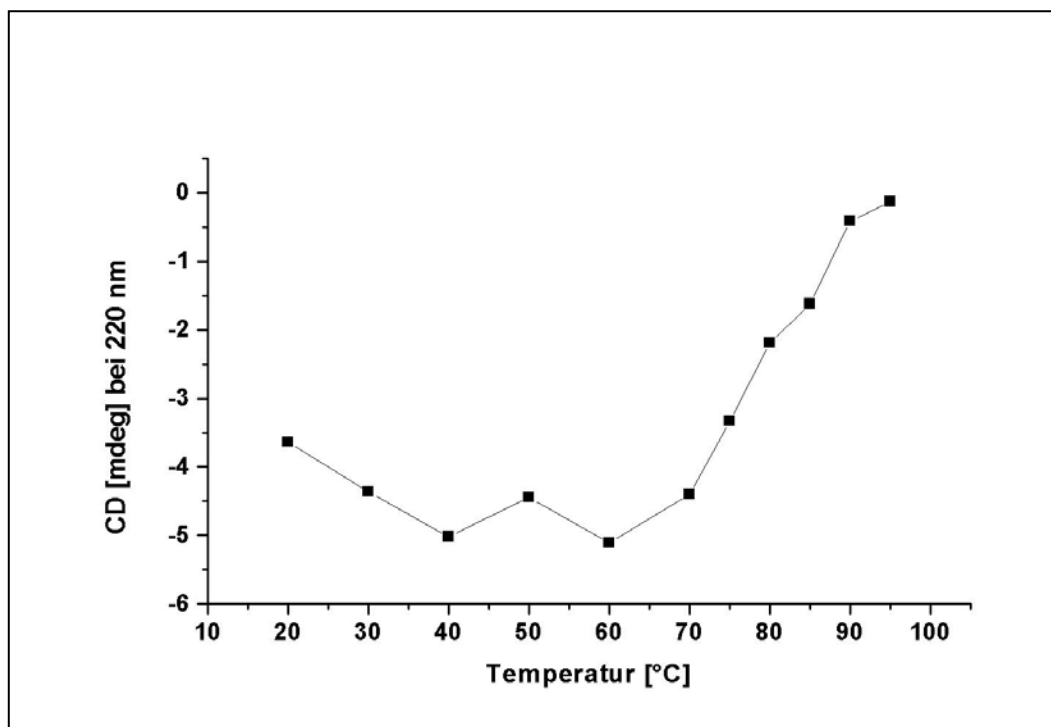


Abb. 27:

**Sekundärstrukturberechnung von HemF.** Dargestellt ist das aufgenommene CD-Spektrum (rote Punkte) und fünf kalkulierte Spektren nach verschiedenen Modellen. Das Modell von Bolotina (hellblau) stimmte am besten mit dem aufgenommenen Spektrum von HemF überein. Auf der Abzisse ist die Wellenlänge [nm] dargestellt und auf der Ordinate die Elliptizität [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$ ].

Zusätzlich wurde mittels CD die Temperaturstabilität von HemF vermessen (Abb. 28). Das Enzym wies eine erstaunliche Stabilität auch bei höheren Temperaturen auf. Zu einer Entfaltung des Enzyms kam es erst ab 85 °C.



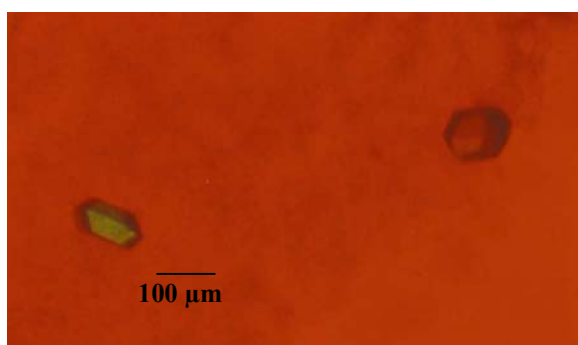
**Abb. 28:** Schmelzkurve von gereinigtem rekombinantem HemF. Die Denaturierung von HemF erfolgt erst bei höheren Temperaturen. HemF befand sich in Thrombin-Spaltungspuffer.

### 3.9 Kristallisation von HemF

Eine endgültige Strukturaufklärung wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von HemF angestrebt. Dazu sollten Proteinkristalle von HemF gewonnen werden. Es wurden 400 Kristallisationsansätze mit den Crystal Screens I und II (Hampton Research, USA) durchgeführt. Zur Überprüfung, ob es sich bei den erhaltenen Kristallen um Protein handelte, wurde die Kristalle entweder röntgenographisch (Dr. Alexander Pautsch, Universität Freiburg, Institut für Organische Chemie und Biochemie, AG Prof. Dr. G. Schulz) untersucht. Oder die Kristalle wurden mit einer Metallschleife gefischt, im Kristallisationspuffer gewaschen, im PAGE-Probenpuffer gelöst und anschließend auf ein SDS-Gel analysiert. Die Bedingungen bei denen Proteinkristalle (Abb. 29)

identifiziert werden konnten, sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Kristalle wuchsen bei 20°C und sie konnten bereits nach 2-3 Tagen beobachtet werden.

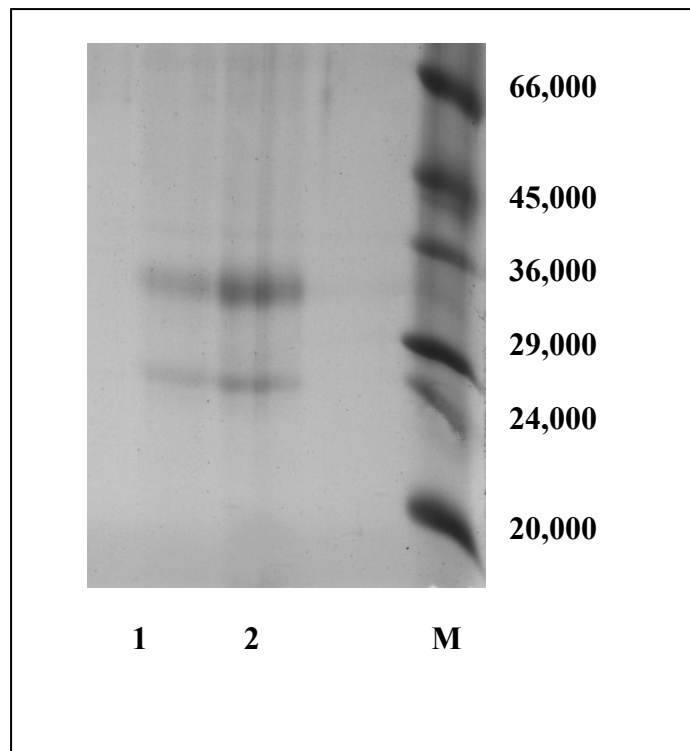
Bei den einige Wochen alten HemF-Kristallen konnte auf den SDS-Gelen eine Fragmentierung des Proteins (Erläuterungen s. 3.7.4) beobachtet werden (Abb. 30). Das kleinere Fragment ist nicht zu sehen, da die kleineren Proteine (auch das kleinste Markerprotein bei 13,700) mit dem angewendeten Gelsystem nicht aufgelöst werden konnten.



**Abb. 29:** Kristalle von HemF. Die Kristalle stammen vom Crystall Screen I Nr.15.

**Tab. 13:** Kristallisationsbedingungen für HemF. Bei allen diesen Bedingungen konnten bei 20°C innerhalb von 3-7 Tagen Proteinkristalle erhalten werden (bei Anwesenheit von C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>).

<i>Bedingung</i>	<i>Pufferzusammensetzung</i>	<i>Habitus maximale Größe [μm]</i>
Crystal Screen I Nr.15	0.2 M Ammoniumsulfat 0.1 M Natriumcacodylat pH 6.5 30% w/v Polyethylenglykol 8000	100 x 150
Crystal Screen I Nr.17	0.1 M Lithiumsulfat Monohydrat 0.1 M Tris/HCl pH 8.5 30% w/v Polyethylenglykol 4000	80 x 100
Crystal Screen I Nr.2	0.4 M Kalium Natriumtartrat Tetrahydrat	50 x 50
Crystal Screen I Nr.3	0.4 M mono-Ammoniumdihydrogenphosphat	40 x 80
Crystal Screen I Nr.30	0.2 M Ammoniumsulfat 30% w/v Polyethylenglykol 8000	60 x 80
Crystal Screen I Nr.31	0.2 M Ammoniumsulfat 30% w/v Polyethylenglykol 4000	50 x 80
Crystal Screen I Nr.42	0.05 M mono-Kaliumdihydrogenphosphat 20% w/v Polyethylenglykol 4000	50 x 80



**Abb. 30:** **SDS-PAGE von Proteinkristallen.** Zu sehen ist das ursprüngliche HemF (bei 34,000) und ein Fragment bei 21,000.  
 Bahn M: Dalton Mark VII, die relative molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben  
 Bahn 1+2: Auf jede Bahn wurde jeweils ein in Probenpuffer gelöster Proteinkristall vom Crystal Screen I Nr. 30 aufgetragen

## 4 DISKUSSION

Es konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Aussagen zur Struktur und Funktion von *Escherichia coli* HemF experimentell belegt werden:

**A) *Escherichia coli hemF* kodiert eine sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase.**

1. Rekombinantes, apparent homogenes HemF katalysiert die enzymatische Umwandlung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX. Substratabnahme und entsprechende Produktbildung wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie und HPLC-basierender Tetrapyrrolanalytik nachgewiesen. Der Zusatz von Cofaktoren wie NADH, NAD<sup>+</sup> und SAM veränderte die Reaktivität des Enzyms nicht. Das Enzym hat einen ungewöhnlich niedrigen optimalen pH-Wert von 6.0.
2. Anaerob präpariertes Enzym aus anaerob gewachsenen Wirtszellen besitzt keine Aktivität. Enzym, das einmal Sauerstoff ausgesetzt war, ist aktiv.

Die kinetischen Daten von *E. coli* HemF für das Substrat Coprogen waren in Übereinstimmung mit bekannten Daten eukaryontischer HemF (Yoshinaga, 1997). Ein klarer Unterschied zu eukaryontischen Enzymen bestand bei dem pH-Optimum der enzymatischen Aktivität. Es lag beim *E. coli* HemF bei 6.0, bei HemF aus Eukaryonten aber zwischen 6.8 und 8.6 (Yoshinaga, 1997). Ein optimaler pH von 6.0 liegt ungewöhnlich weit im sauren Bereich. Interessanterweise bewegt sich damit das pH-Optimum in dem Bereich des pK<sub>s</sub>-Wertes der Seitenkette von Histidin (6.03). Der nicht vorhandene Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität von HemF steht in Übereinstimmung mit den Mutationsstudien des potentiellen GGGTP-Motivs.

**B) Histidin-koordinierte Manganionen sind essentiell für die sauerstoffabhängige Katalyse.**

1. Die Enzymaktivität ist durch Metallchelatoren inhibierbar.
2. Nur der Zusatz von Mangan rekonstituiert die HemF Aktivität. Die Aktivität rekombinant präparierten Enzyms läßt sich ohne Chelatorbehandlung mit Manganzusatz ca. verdoppeln.
3. HemF zeigt einen für Metallenzyme typisches Absorptionsmaximum von 406 nm.
4. Mittels MCD-Spektroskopie konnten drei für Metallenzyme typische Maxima bei 418, 454 und 487 nm gefunden werden.
5. AAS identifizierte mindestens 0.5 Manganionen pro HemF-Dimer. Die fast 100 %ige Stimulierbarkeit rekombinanten HemF durch Manganzusatz deutet aber auf durch den Überproduktionsprozeß verursachten Manganmangel hin, so daß mindestens 1 Manganatom pro Dimer zu erwarten sind.
6. Die Eliminierung der komplett konservierten Histidinreste H96, H106, H145 und H175 mittels gerichteter Mutagenese führte zur kompletten Inaktivierung des Enzyms.

Die einzige Mutagenese-Studie für Eukaryonten zeigte die katalytische Relevanz von Histidin 158 aus der Maus (Kohno *et al.*, 1996). Auch bei eukaryontischen HemF verringerte die Addition von Chelatisierungsreagenzien die Aktivität von HemF. Allerdings konnte keine Reaktivierung mittels Metallzusatz demonstriert werden (Sano *et al.*, 1961; Hsu *et al.*, 1970). Im Rahmen dieser Arbeit ist zum ersten Mal die Reaktivierung eines durch mehrfache Addition verschiedener Chelatisierungsreagenzien vollständig inaktivierten Enzyms gelungen. Dazu mußte HemF allerdings erst mit Harnstoff entfaltet werden und dann wurde das Enzym in Anwesenheit von Metallionen wieder renaturiert. Diese Ergebnisse weisen auf mindestens ein Metallion im Innern der Tertiärstruktur von HemF hin. Der Nachweis von Metallionen mittels AAS erwies sich als sehr schwierig, eine Erfahrung, die ebenfalls bei den eukaryontischen HemF gemacht wurde. Aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Mangans läßt es sich während der Reinigungsprozedur leicht gegen andere zweiwertige Metallionen austauschen (s. 1.4). Die Metallionen, die in eukaryontischen HemF gefunden wurden (Fe, Cu), zeigten sowohl bei den früher durchgeführten eukaryontischen Untersuchungen, wie bei *E. coli* HemF, keinerlei Einfluß auf die katalytische Aktivität des Enzyms (Yoshinaga *et al.*, 1980b; Medlock *et al.*, 1996).



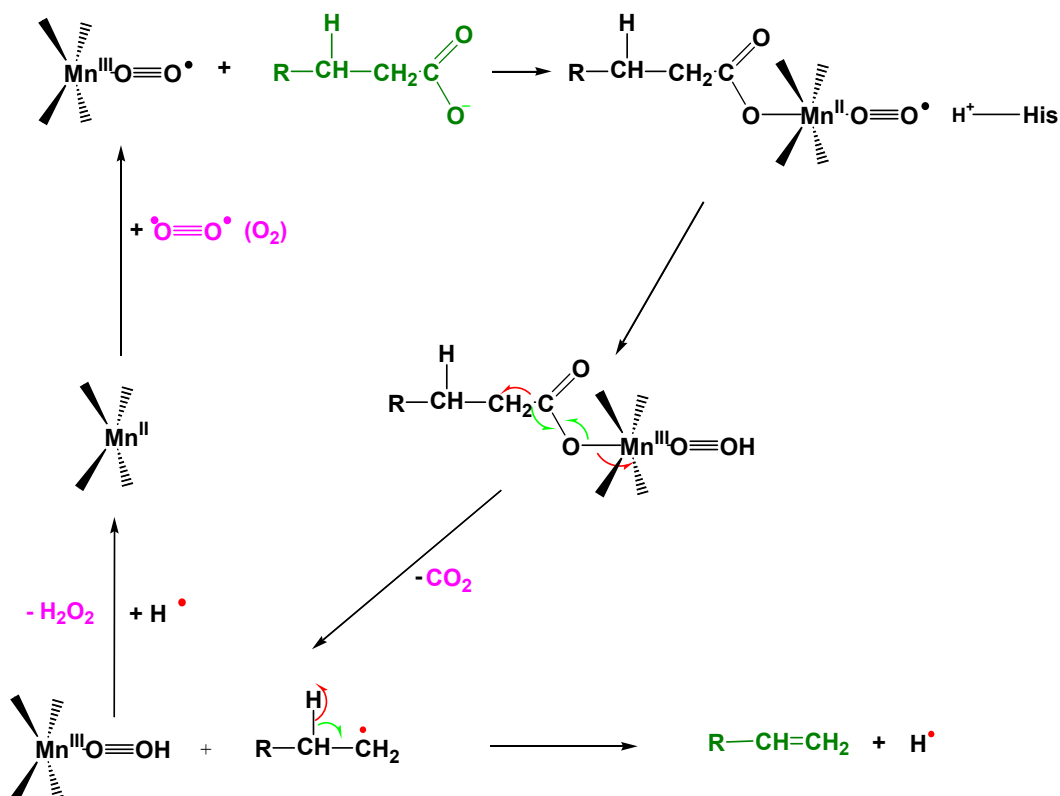
**C) Die sauerstoffabhängige, Mangan-vermittelte Katalyse von *E. coli* HemF ist radikalischer Natur.**

1. Der Zusatz sterisch kleiner Radikalfänger (Dimethylthioharnstoff, DMSO) reduziert die Enzymaktivität signifikant.
2. Die Reaktion führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid.

Überraschend war die anaerobe Enzymaktivität von HemF, die sich durch Addition von sterisch kleinen Radikalfängern verringern ließ. Voraussetzung für diese anaerobe Aktivität war ein vorangegangener (auch Tage vorher) Kontakt von HemF mit Sauerstoff. Es gelang der Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der enzymatischen Reaktion, wobei das Peroxid aus molekularem Sauerstoff stammen mußte, da kein anderer Elektronenakzeptor in den Enzymtest-Ansätzen vorhanden war. Dieses Ergebnis zeigt, zusammen mit der Erkenntnis daß eine anaerobe Aktivität von HemF vorliegt, daß der Sauerstoff am Metall des Enzyms koordiniert stabilisiert werden kann bevor er im Rahmen einer radikalischen Reaktion als Elektronenakzeptor unter Bildung von Wasserstoffperoxid dient.

**D) Integration der gewonnenen Daten zu einer neuartigen Hypothese für einen Enzymmechanismus für *E. coli* HemF.**

Diese letzte Information ermöglichte es eine Hypothese für einen Mechanismus der von HemF katalysierten Reaktion zu postulieren (Abb. 31). Als zentrales Objekt der Katalyse fungiert ein von Histidinen koordiniertes Manganion. Am Anfang der Reaktion liegt das Metall als zweiwertiges Ion vor. Sobald die Bindung von molekularem Sauerstoff erfolgt, wird das Mangan formal zu Mangan(III) oxidiert. Dieser möglicherweise quadratisch pyramidiale Komplex stellt für das Mangan eine häufig vorkommende und stabile Koordinationsgeometrie dar. Dieser Mangan-Sauerstoff-Komplex, der aerob produziert wurde, erklärt die anaerobe Aktivität von HemF. Anschließend bindet das Manganion am Sauerstoff der ersten Propionatgruppe und wird formal zu Mn(II) reduziert. Durch den Abzug der Elektronen aus der Propionatgruppe wird die Abspaltung des Kohlendioxid erleichtert. Der elektronenziehende Effekt wird dabei wahrscheinlich von dem Mangan-koordinierten Sauerstoffmolekül vermittelt, indem es ein Elektron vom Mangan abzieht um damit am endständigen Sauerstoffatom eine negative Ladung zu lokalisieren. Durch diese negative Ladung kann ein Proton von einem Histidin auf das Sauerstoffmolekül übertragen werden. Dieser Vorgang ist notwendig, um die Elektronenladungen auszugleichen.

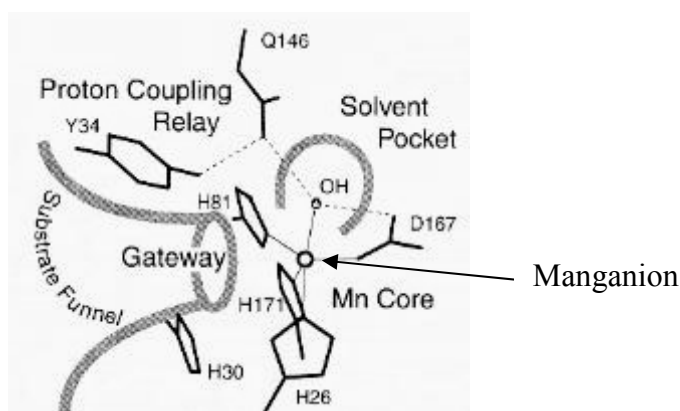


**Abb. 31:** Der postulierte Mechanismus für die von HemF katalysierte enzymatische Reaktion. Das Substrat Coprogen und das Produkt Protogen sind verkürzt in dunkelgrün dargestellt. Die ein- und austretenden Moleküle inklusive des zentralen Mangan-Komplexes sind in rosa gezeigt. In verschiedenen Farben sind homogene Bindungsspaltungen und die daraus resultierenden Radikale und Elektronenpaare dargestellt. R, restliches reduzierte Tetrapyrrolgrundgerüst.

Damit wird auch das ungewöhnliche pH-Optimum erklärbar. Bei pH 6 sind Histidinreste in der Lage Protonen aufzunehmen und abzugeben. Das Abspalten des Kohlendioxid muß radikalisch ablaufen, da nur so ein Elektron auf das Mangan übertragen werden kann. Die folgende homogene Abspaltung des Wasserstoffatoms zur Vinylgruppe läuft praktisch automatisch ab, da das Radikal am  $\beta$ -C-Atom nicht stabilisiert wird. Danach erfolgt die Übertragung des abgespaltenen Wasserstoffradikals auf die Peroxidgruppe und deren Abspaltung als Wasserstoffperoxid vom Mangan. Damit einher geht eine formale Reduktion des Mangans zu Mangan(II). Hier schließt sich der katalytische Zyklus und man erhält wieder den am Anfang beschriebenen Mangan-Komplex. Aus diesem Mechanismus ist ersichtlich, daß ein Sauerstoffmolekül als Elektronenakzeptor für die Umsetzung von einer Propionatgruppe notwendig ist.

Dieser postulierte Mechanismus findet seine Vorbilder in natürlich vorkommenden enzymatischen Katalysezentren von Mn-haltigen Proteinen (s. 1.4). Die Koordinationsgeometrie eines quadratisch bipyramidalen Mn-Komplexes ist ein notwendiger und in allen enzymatischen

Mn-Komplexen existierender Übergangszustand. Am häufigsten besitzen Mn-Komplexe, unabhängig vom Redoxzustand, die Koordinationszahl 5 oder 6. Diese Koordinationszahl wird bei Abwesenheit von Substraten oder Cofaktoren durch Addition von Wasser- oder anderen Lösungsmittelmolekülen erreicht. Als Beispiel dafür ist in Abb. 32 das mononukleare aktive Zentrum der Mn-Superoxid-Dismutase gezeigt, das in diesem Fall eine Koordinationszahl von 5 aufweist. Die Ligationssphäre des Mangans wird von drei Histidinen, einem Aspartat und einem Hydroxyl (aus Wasser) gebildet (Whittaker, 2000).



**Abb. 32:** **Katalysezentrum der *E. coli* Mn-Superoxid-Dismutase.** Zu sehen ist ein fünffach koordiniertes Manganion, wobei ein Ligand ein Lösungsmittelmolekül (OH) ist. Dieser Ligand kann leicht gegen andere Moleküle ausgetauscht werden und befindet sich in einer Lösungsmitteltasche. Entgegengesetzt existiert ein Substrat-Trichter, von wo aus das Substrat an das Manganion binden kann

An diesem Beispiel ist auch gezeigt, daß mehrere Histidinreste ein Mangan koordinieren können. Auch für das Binden der Propionatgruppe des Tetrapyrrols am Mangan gibt es Beispiele von anderen Enzymsystemen. Die Mn-Peroxidase enthält ein mononukleares Mn-Zentrum, wobei ein Ligand die Propionatgruppe eines Häm-Cofaktors darstellt (Gold *et al.*, 2000). Das Binden von Sauerstoff an Manganzentren in Enzymen wurde schon in der Einleitung in 1.4 diskutiert. Bei der Mn-Peroxidase und Mn-Superoxid-Dismutase wechselt der Redoxzustand des Mangans zwischen II und III (Hoganson, 2000).

Ausgehend von dem für HemF postulierten Mechanismus ist auch ersichtlich warum Radikalfänger die enzymatische Reaktion nur verringern aber nicht vollständig auslöschen konnten. Als Angriffspunkt für Radikalfänger kommt nur der anfangs der Reaktion gebildete stabile Mn(III)-Sauerstoffkomplex in Frage, da das Ethylradikal nur ein kurzzeitig gebildetes Zwi-

schenprodukt darstellt. Dieser Mechanismus läßt außerdem folgende Vorhersagen zu: Das HemF sollte als Dimer mindestens ein Manganion enthalten. Dieses Manganion würde dann von Histidinen aus verschiedenen HemF-Monomeren koordiniert werden. Damit wären noch Koordinationsstellen für mindestens ein weiteres Metallion frei, vielleicht zur Ausbildung des Dimer. Aber es wäre anhand der Anzahl an hochkonservierten Histidinen auch möglich, daß zwei Manganionen und damit zwei getrennte katalytische Zentren pro HemF-Dimer vorliegen.

---

## 5 AUSBLICK

Basierend auf den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit können in naher Zukunft folgende Punkte bearbeitet werden:

- Röntgenographische Untersuchung der HemF-Kristalle.
- Biophysikalische Untersuchung der nicht-aktiven Mutanten. Eine Metallbestimmung könnte Beweise für die Hypothese erbringen, daß das Manganion von Histidinresten koordiniert wird. Eine Beteiligung an der Oligomerisation kann mittels GPC bestimmt werden. Geklärt werden muß außerdem die Rolle des Trp274 in der Katalyse.
- Genauere Charakterisierung des Metallzentrums in HemF mittels VT-MCD (variable temperature MCD), Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) und XANES / EXAFS. Durch MCD-Messungen bei tiefen Temperaturen werden die metallischen MCD-Signale wesentlich verstärkt. Die dann zu beobachtende Feinaufspaltung der Spektren kann helfen die Art des Mangan-Zentrums zu identifizieren. Zusätzlich sollte die Beobachtung der Änderung in der Mn-Koordinationssphäre während der Reaktion mittels Inhibitorstudien möglich sein. Verschiedene Oxidationszustände des Manganions können mittels ESR unterschieden werden.
- Genauere Charakterisierung des Metallzentrums in HemF durch Addition von Anionen wie Azid, Cyanid und Fluorid. Eine spektroskopische und kinetische Charakterisierung der mit diesen Inhibitoren gebildeten Mn-Komplexe kann zu einem besseren Verständnis des nativen Mn-Sauerstoff-Komplexes führen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### 6.1 *Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten sauerstoffabhängigen CoproporphyrinogenIII Oxidase (HemF) aus Escherichia coli*

Tetrapyrrole sind essentielle Bestandteile biologischer Systeme. Defekte der Biosynthese-Enzyme können bei höheren Tieren zu chronischen Krankheiten führen. Coproporphyrinogen III Oxidasen katalysieren im Rahmen der Tetrapyrrol-Biosynthese die Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX. Diese Reaktion entspricht einer oxidativen Decarboxylierung zweier Propionatreste zu Vinylgruppen. Drei unterschiedliche Enzyme katalysieren die Reaktion ohne und mit Nutzung von Sauerstoff. Der Enzymmechanismus aller drei Oxidasen ist unbekannt.

Das sauerstoffabhängige Enzym (HemF) aus *Escherichia coli* wurde rekombinant produziert und mit einer neu entwickelten Methode affinitätschromatographisch gereinigt. Es konnte ein schneller fluorimetrischer Aktivitätsnachweis etabliert werden und die katalysierte Reaktion mittels HPLC bewiesen werden. Das als Dimer aktive HemF zeigte einen  $K_m$ -Wert von 2.6  $\mu\text{M}$  und einen  $k_{cat}$  von 0.17  $\text{min}^{-1}$  bei einem pH-Optimum von 6.0. Chelatisierungsreagenzien verringerten signifikant die enzymatische Aktivität von HemF. Als einziges Metall rekonstituierte Mangan die Enzymaktivität. Mangan konnte schließlich im Enzym mittels UV / VIS-Spektroskopie, magnetischem Zirkulardichroismus (MCD) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) nachgewiesen werden. Mutagenese-Studien identifizierten H96, H106, H145, H175 und W274 als bedeutsam für die Katalyse. Als Produkt der enzymatischen Reaktion konnte Peroxid identifiziert werden. Überraschend konnte eine anaerobe Enzymaktivität von HemF gezeigt werden. Es wurden Hinweise für eine radikalische Reaktion bei der Umsetzung des Coproporphyrinogen III gefunden. Bei ersten Kristallisationsexperimenten wurden kleine Proteinkristalle erhalten.

Die erhaltenen Daten wurden in eine Hypothese für einen neuen Reaktionsmechanismus integriert. Dieser enthält als zentrales Objekt der Katalyse einen redoxaktiven Mangan-Komplex, wobei das Manganion wahrscheinlich von den identifizierten Histidinen koordiniert wird.

---

## 6.2 ***Purification and characterization of recombinant Escherichia coli oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF)***

Tetrapyrroles are essential for life and therefore present in most biological systems. The seventh enzyme of the tetrapyrrole biosynthesis is the coproporphyrinogen III oxidase, representing three different types of enzymes. The catalyzed reaction is an oxidative decarboxylation transforming coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX.

The recombinant *E. coli* oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase was purified to apparent homogeneity using a modified affinity chromatography system. Kinetically data were determined via a fluorimetric assay and HPLC. The dimeric enzyme showed a  $K_m$  value of 2.6  $\mu\text{M}$  with a  $k_{cat}$  value of 0.17  $\text{min}^{-1}$  at an optimal pH of 6. Addition of chelating reagents drastically reduced the enzymatic activity of HemF. Only manganese addition reconstituted HemF activity. Manganese was further identified as native metal in HemF using UV / VIS-spectroscopy, magnetic circular dichroism (MCD) and atomic absorption spectroscopy (AAS). Site-directed mutagenesis identified H96, H106, H145, H175 and W274 as important amino acid residues for catalysis. Peroxide was identified as product of the enzymatic reaction. Surprisingly an anaerobic activity of HemF was detected. Indications for a radical enzymatic process were observed. Finally protein crystals of HemF were obtained.

A mechanism for the enzymatic reaction of HemF was postulated based on the obtained data. The radical mechanism includes a redox active manganese-oxygen-complex inside the protein. The manganese-ion is probably bound by the highly conserved histidin residues.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, B. D., Sono, M., Boutaud, O., Shriner, A., Dawson, J. H., Brash, A. R. & Gaffney, B. J.** (2001) Characterization of the coral allene oxide synthase active site with UV-visible absorption, magnetic circular dichroism, and electron paramagnetic spectroscopy: Evidence for tyrosinate ligation to the ferric enzyme heme iron. *Biochemistry* 40, 2251-2259.
- Akhtar, M.** (1994) The biosynthesis of the tetrapyrrole pigments (P. M. Jordan, ed.), pp131-155, Wiley, Chichester.
- Atta, M., Nordlund, P., Aberg, A., Eklund, H. & Fontecave, M.** (1992) Substitution of manganese for iron in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. Spectroscopic and crystallographic characterization. *J. Biol. Chem.* 267, 20682-20688.
- Bartosz, G., Janaszewska, A., Ertel, D. & Bartosz, M.** (1998) Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 519-528.
- Burden, A. E., Wu, C.-K., Dailey, T. A., Busch, J., Rose, J. P., Wang, B.-C. & Dailey, H. A.** (1999) Human ferrochelatase. Crystallization, characterization of the [2Fe-2S] cluster and determination that the enzyme is a homodimer. *Biochem. Biophys. Acta* 1435, 191-197.
- Camadro, J. M., Chambon, H., Jolles, J. & Labbe, P.** (1986) Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *saccharomices cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 156, 579-587.
- Copeland, R. A.** (1996) Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. Wiley-VCH. New York.
- Dailey, H. A., Jones, C. S., & Karr, S. W.** (1989) Interaction of free Porphyrins and metalloporphyrins with mouse ferrochelatase. A model for the active site of ferrochelatase. *Biochim. Biophys. Acta* 999, 7-11.
- Dailey, T. A., Meissner, P. & Dailey, H. A.** (1994) Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 813-815.
- Dailey, H. A. & Dailey, T. A.** (1996) Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*. Expression, purification, and characterization of the cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 8714-8718.
- Dismukes, G. C.** (1996) Manganese enzymes with binuclear active sites. *Chem. Rev.* 96, 2909-2926.
- Dhawan, I. K., Shelver, D., Thorsteinsson, M. V., Roberts, G. P. and Johnson, M. K.** (1999) Probing the heme axial ligation in the CO-sensing CooA protein with magnetic circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* 38, 12805-12813.
- Dower, W.J., Miller, J.F., & Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.
- Dumas, D. P. & Raushel, F. M.** (1990) Chemical and kinetic evidence for an essential histidine in the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biol. Chem.* 265, 21498-21503.
- Elder, G. H. & Evans, J. O.** (1978) Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem. J.* 172, 345-347.
- Epperly, B. R. & Dekker, E. E.** (1989) Inactivation of *Escherichia coli* L-threonine dehydrogenase by 2,3-Butanedione. *J. Biol. Chem.* 264, 18296-18301.
- Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D., Heinz, D. W.** (1999a). High resolution crystal structure of a  $Mg^{2+}$ -dependent porphobilinogen synthase. *J. Mol. Biol.* 289, 591-602.



- Frankenberg, N., Jahn, D., Heinz, D. W.** (1999b). Production, purification and characterization of a Mg<sup>2+</sup>-responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 38, 13968-13975.
- Frankenberg, N., Jahn, D., Jaffe, E. K.** (1999c). *Pseudomonas aeruginosa* contains a novel type V porphobilinogen synthase with no required catalytic metal ions. *Biochemistry* 38, 13976-13982.
- Gill, S. C. & van Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequences data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Gold, M. H., Youngs, H. L. & Sollewijn Gelpke, M. D.** (2000) In *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological systems*, vol. 37 (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 559-586, Marcel Dekker, New York.
- Gora, M., Grzybowska, E., Rytka, J. & Labbe-Bois, R.** (1996) Probing the active-site residues in *Saccharomyces cerevisiae* ferrochelatase by directed mutagenesis. In vivo and in vitro analysis. *J. Biol. Chem.* 271, 11810-11816.
- Görge, G. & Boland, W.** (1989) Biosynthesis of 1-alkenes in higher plants: stereochemical implications. A model study with *Carthamus tinctorius* (Asteraceae). *Eur. J. Biochem.* 185, 237-242.
- Grandchamp, B., Phung, N. & Nordman, Y.** (1978) The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase. *Biochem. J.* 176, 97-102.
- Grandchamp, B., Nordmann, Y.** (1982) Coproporphyrinogen III oxidase assay. *Enzyme* 28, 196-205.
- Hansson, M. & Al-Karadaghi, S.** (1995) Purification, crystallization, and preliminary X-ray analysis of *Bacillus subtilis* ferrochelatase. *Proteins* 23, 607-609.
- Hefler, S. K., & Averill, B. A.** (1987) The "manganese(III)-containing" purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146, 1173-1177.
- Hoganson, C. W. & Babcock, G. T.** (2000) Mechanistic aspects of the tyrosyl radical-manganese complex in photosynthetic water oxidation. *Met. Ions. Biol. Syst.* 37, 613-656.
- Homuth, G., Rompf, A., Schumann, W. & Jahn, D.** (1999) Characterization of *Bacillus subtilis* hemZ. *J. Bacteriol.* 181, 5922-5929.
- Horwitz, J. & Heller, J.** (1974) Modification of tryptophan residues in retinol-binding protein and prealbumin with 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide. *J. Biol. Chem.* 249, 7181-7185.
- Hsu, P. W. & Miller, G. W.** (1970) Coproporphyrinogenase in tobacco. *Biochem. J.* 117, 215-220.
- Ilag, L. L. & Jahn, D.** (1991) Activity and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase and the putative active site mutant K265R. *Biochemistry* 31, 7143-7151.
- Jackson, A. H., Jones, D. M., Philip, G., Lash, T. D. & DEL C. Batlle, A. M.** (1980) Synthetic and biosynthetic studies of porphyrins. *Int. J. Biochem.* 12, 681-688.
- Jahn, D., Verkamp, E., & Söll, D.** (1992) Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 215-218.
- Jahn, D., Hungerer, C., & Troup, B.** (1996) Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakterielle Hämbiosynthese. *Naturwissenschaften* 83, 389-400.
- Jordan, P. M.** (1991) The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid and its transformation into uroporphobilinogen III. In Biosynthesis of tetrapyrroles (P. M. Jordan, ed.), pp1-47, Elsevier, Amsterdam.
- Kishi, K., Hildebrand, D. P., Kusters-van Someren, M., Gettemy, J., Mauk A. G. & Gold, M. H.** (1997) Site-directed mutations at phenylalanine-190 of manganese peroxidase: effects on stability, function, and coordination. *Biochemistry* 36, 4268-4277.
- Kleanthous, C., Campbell, D. G. & Coggins, J. R.** (1990) Active site labeling of the shikimate pathway enzyme, dehydroquinase. *J. Biol. Chem.* 265, 10929-10934.

- Klemm, D. J. & Barton, L. L.** (1987) Purification and properties of protoporphyrinogen oxidase from an anaerobic bacterium, *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 169, 5209-5215.
- Klinman, J. P. & Mu, D.** (1994) Quinoenzymes in biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 299-344.
- Kohno, H., Okuda, M., Furukawa, T. & Taketani, S.** (1994) Site-directed mutagenesis of human ferrochelatase: identification of histidine-236 as a binding site for metal ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1209, 95-100.
- Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R., Taketani, S. & Yoshinaga, T.** (1996) Mouse coproporphyrinogen oxidase is a copper-containing enzyme: expression in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1292, 156-162.
- Kruse, E., Mock, H.-P. & Grimm, B.** (1995) Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco-sequence analysis and initial expression studies. *Planta* 196, 796-803.
- Labbe, P., Camadro, J.-M. & Chambon, H.** (1985) Fluorometric assays for coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrinogen oxidase. *Anal. Biochem.* 149, 248-260.
- Labbe, P.** (1997) Purification and properties of coproporphyrinogen III oxidase from yeast. *Methods Enzymol.* 281, 367-378.
- Lämmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larrabee, J. A., Alessi, C. M., Asiedu, E. T., Cook, J. O., Hoerning, K. R., Klingler, L. J., Okin, G. S., Santee, S. G. & Volkert, T. L.** (1997) Magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of geometric and electronic structure of cobalt(II)-substituted proteins: Ground-state zero-field splitting as a coordination number indicator. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 4182-4196.
- Layer, G.** (2001) Untersuchung der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemN) aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Freiburg.
- Le Guen, L., Santos, R. & Camadro, J. M.** (1999) Functional analysis of the hemK gene product involvement in protoporphyrinogen oxidase activity in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 175-182.
- Li, J. & Dasgupta, P. K.** (2000) Measurement of atmospheric hydrogen peroxide and hydroxymethyl hydroperoxide with a diffusion scrubber and light emitting diode-liquid core waveguide-based fluorimetry. *Anal. Chem.* 72, 5338-5347.
- Lischwe, M. & Sung, M. T.** (1977) Use of N-Chlorosuccinimide / Urea for the selective cleavage of tryptophanyl peptide bonds in Proteins. *J. Biol. Chem.* 252, 4976-4980.
- Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. C., Wood, S. P., Warren, M. J., Woodcock, S. C. & Jordan, P. M.** (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* 359, 33-39.
- Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. C., Wood, S. P., Malashkevich, V. N., Hadener, A., Warren, M. J., & Shoolingin-Jordan, P. M.** (1996) The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76-Å resolution. *Proteins* 25, 48-78.
- Matringe, M., Camadro, J. M., Labbe, P. & Scalla, R.** (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260, 231-235.
- Mc Pherson, A.** (1990) Current approaches to macromolecules crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23.
- Medlock, A. E. & Dailey, H. A.** (1996) Human coproporphyrinogen oxidase is not a metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 271, 32507-32510.
- Miller, A. D., Packman, L. C., Hart, G. J., Alefounder, P. R., Abell, C. & Battersby, A. R.** (1989) Evidence that Pyridoxal phosphate modification of lysine residues (Lys-55 and Lys-59) causes inactivation of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase). *Biochem. J.* 262, 119-124.

- Mimuro, M., Kobayashi, M., Shimada, K., Uezono, K. and Nozawa, T. (2000) Magnetic circular dichroism properties of reaction center complexes isolated from the zinc-bacteriochlorophyll *a*-containing purple bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Biochemistry* 39, 4020-4027.
- Moore, M. R. (1990) In: Dailey, H. A. (ed) Biosynthesis of heme and chlorophylls, Mc Graw-Hill, New York, 1-54.
- Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. & Jahn, D. (1999) *Methanopyrus kandleri* Glutamyl-tRNA Reductase. *J. Biol. Chem.* 274, 30679-30685.
- Moser, J., Schubert, W. D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* 20, 6583-6590.
- Randall, D. W., Gamelin, D. R., LaCroix, L. B. & Solomon, E. I. (2000) Electronic structure contributions to electron transfer in blue Cu and Cu<sub>A</sub>. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 16-19.
- Righetti, P.G., Gianazza, E., Gelfi, C. & Chairri, M. (1990) In *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* (Hames, B.D. & Rickwood, D. eds) 2<sup>nd</sup> Ed., pp. 149-214, Oxford University Press, Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) In *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation. *J. Biol. Chem.* 236, 1173-1180.
- Sasarman, A., Letowski, J., Czaika, G., Ramirez, V., Nead, M. A., Jacobs, J. M. & Morais, R. (1993) Nucleotide sequence of the hemG gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12. *Can. J. Microbiol.* 39, 1155-1161.
- Sauerwald, A. (2000) Katalytisch relevante Aminosäurereste der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Freiburg.
- Seehra, J. S., Jordan, P. M. & Akhtar, M. (1983) Anaerobic and aerobic coproporphyrinogen III oxidases of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.* 209, 709-718.
- Smith, A. G., Marsh, O. & Elder, G. H. (1993) Investigation of subcellular location of the tetrapyrrole biosynthesis enzyme in higher plants. *Biochem. J.* 292, 503-508.
- Snatzke, G. (2000) In *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R. W. eds.), pp. 1-36, Wiley-VCH, New York.
- Sokolovsky, M., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1966) Tetranitromethane, a reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry* 5, 3582-3589.
- Solomon, E. I., Sudarama, U. M. & Machonkin, T. E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563-2605.
- Sorianello, E. M. & Mazzetti, M. B. (2000) Simple and rapid method for the determination of coproporphyrinogen oxidase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods* 45, 75-86.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- Sugiura, Y., Kawabe, H., Tanaka, H., Fujimoto, S. & Ohara, A. (1981) Purification, enzymatic properties, and active site environment of a novel manganese(III)-containing acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 256, 10664-10670.
- Troup, B. Hungerer, C., & Jahn, D. (1994) Isolation of the *hemF* operon containing the *Escherichia coli* aerobic coproporphyrinogen III oxidase by *in vivo* complementation of a yeast *Hem13* mutant. *J. Bacteriol.* 176, 673-680.
- Troup, B. Hungerer, C., & Jahn, D. (1995) Cloning and characterization of the *Escherichia coli hemN* gene encoding oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase. *J. Bacteriol.* 177, 3326-3331.

- Verführth, K.** (1999) Das *Escherichia coli hemN*-Gen kodiert für einen Bestandteil der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrin III Oxidase. Diplomarbeit Universität Freiburg.
- Wariishi, H., Akileswaren, L. & Gold, M. H.** (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27, 5365-5370.
- Warren, M. J. & Jordan, P. M.** (1988) Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* propionibilinogen deaminase. *Biochemistry* 27, 9020-9030.
- Whitby, F. G., Phillips, J. D., Kushner, J. P. & Hill, C. P.** (1998) Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.* 17, 2463-2471.
- White, B. A.** (ed.) (1993) PCR Protocols. Human Press. Totowa, NJ.
- Whittaker, J. W.** (2000) In *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological systems*, vol. 37 (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 587-612, Marcel Dekker, New York.
- Wieghardt, K.** (1989) Die aktiven Zentren in manganhaltigen Metalloproteinen und anorganischen Modellkomplexen. *Angew. Chem.* 101, 1179-1198.
- Wu, C.-K., Dailey, T. A., Rose, J. P., Burden, A. E., Sellers, V. M. & Wang, B.-C.** (2001) The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nature Struct. Biol.* 8, 156-160.
- Yoder, D. W., Hwang, J., & Penner-Hahn, J. E.** (2000) In *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological systems*, vol. 37 (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 527-558, Marcel Dekker, New York.
- Yoshinaga, T. & Sano, S.** (1980a) Coproporphyrinogen oxidase, reaction mechanism and the role of tyrosine residues on the activity. *J. Biol. Chem.* 255, 4727-4731.
- Yoshinaga, T. & Sano, S.** (1980b) Coproporphyrinogen oxidase, purification, properties and activation by phospholipides. *J. Biol. Chem.* 255, 4722-4726.
- Yoshinaga, T.** (1997) Purification and properties of coproporphyrinogen III oxidase from bovine liver. *Methods Enzymol.* 281, 355-367.

## DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Jahn bedanken, der mir jede vorstellbare Unterstützung gewährte und für jede neue Idee zugänglich war.

Ein besonderer Dank gilt auch den Diplomanden, die ich betreuen und mit denen ich neue Wege gehen durfte: Gunhild Layer, Anselm Sauerwald und Knut Verfürth.

Meinen Mitarbeiter-Praktikanten Eva Frickel, Stefan Stolpe, Kyrill Schwarz-Herion, Ulli Rothweiler, Christian Fufezan und Martin Allgaier möchte ich für ihr Engagement danken.

Ich möchte unseren Computer-Experten danken, die bei Problemen und Fragen jederzeit ansprechbar waren: Marco Marino und Heiko Barg.

Mein Dank gilt auch Dr. Nicole Frankenberg für die Einarbeitung und die Einführung in den Kreis der Tetrapyrrol-Gemeinde.

Danken möchte ich auch Antonio Espin für die gute Zusammenarbeit, Christoph Warth für die ESI-MS-Messungen, Dr. Emile Schiltz für die N-terminalen Sequenzierungen, Dr. Gabor Igloi für die zahlreichen DNA-Sequenzierungen, "Victor" Nasser Gad'on mit seinem 200 l-Fermenter, Dr. Alexander Pautsch für die Unterstützung zum Thema Proteinkristalle und Patrick Wunsch für die einführenden AAS-Messungen.

Mein Dank gilt insbesondere den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Ak Jahn. Eine gute Arbeit kann nur in guter Atmosphäre und mit der freundschaftlichen Unterstützung der Kollegen gelingen, so daß ich mich neben jenen, die ich schon erwähnt habe hier noch bei folgenden Jahnlingsen besonders bedanken möchte: Hanna Fritzsche, Frederic Frère, Stefan Lorenz, Martin Eschbach, Dr. Alexandra Rompf, Jan Martens, Maja Lindenmeyer, Manuela Schätzle, Nicole Quäck und Dr. Max Schobert. Besondere Erwähnung verdient dabei Dr. Jürgen Moser für die Diskussionsbereitschaft und die Mühen bei der Korrektur.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und meinem Onkel Herbert Wieczorek (Dipl.-Chem.), der mich schon als Kind inspirierte.

# Lebenslauf von Esther Mahlitz

## **Persönliche Daten**

Geburtsdatum	3. April 1971
Geburtsort	Berlin-Wilmersdorf
Eltern	Ilka-Gabriele Mahlitz und Jürgen Mahlitz

## **Schulausbildung**

1976-1977	Vorschule der Stechlinsee-Grundschule, Berlin-Friedenau
1977-1983	Stechlinsee-Grundschule, Berlin-Friedenau
1983-1990	Rheingau-Gymnasium, Berlin-Friedenau, Abitur als Abschluß
	Leistungskurse: Chemie und Erdkunde
	schriftl.Prüfungsfach: Physik
	mündl.Prüfungsfach: Deutsch

## **Studium**

1990-1997	Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin
1993	Ablegung der Diplom-Vorprüfung
1993-1996	Chemie Hauptstudium
	Schwerpunktfach: Organische Chemie
	Wahlfach: Technische Makromolekulare Chemie
	Freiwilliges 2. Wahlfach: Biochemie
1994	Mitgliedschaft in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)
1996-1997	Diplomarbeit im Max-Volmer Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie unter der Anleitung von PD Dr.J. Vater, Thema: Untersuchungen zur Biosynthese der Lipopeptid-Antibiotika in <i>Bacillus subtilis</i>
ab 1998	Beginn der Promotion im Institut für Organische Chemie und Biochemie, Albert-Ludwigs Universität Freiburg unter der Anleitung von Prof.Dr. Dieter Jahn, Mitglied im Graduiertenkolleg "Biochemie der Enzyme"
1998	Mitgliedschaft in der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)
2000	Umzug mit dem Arbeitskreis nach Braunschweig, Fortführung der Promotion am Institut für Mikrobiologie